

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**INTERACCIONES ENTRE LA RUTA DE p38 α
MACK Y LAS RUTAS Rac-1 Y C3G EN LA
RESPUESTA AL ESTRÉS: IMPLICACIONES
FUNCIONALES.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Álvaro Gutiérrez Uzquiza

Bajo la dirección de la doctora

Almudena Porras Gallo

Madrid, 2010

• ISBN: 978-84-693-4090-5

© Álvaro Gutiérrez Uzquiza, 2009



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA, DPTO. DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

**Interacciones entre la ruta de p38 α MAPK y las rutas
de Rac-1 y C3G en la respuesta a estrés.**
Implicaciones funcionales.

TESIS DOCTORAL

ÁLVARO GUTIÉRREZ UZQUIZA

Madrid, 2009



El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Álvaro Gutiérrez Uzquiza, bajo la dirección de la Dra. Almudena Porras Gallo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia.

Opta al grado de Doctor

Álvaro Gutiérrez Uzquiza

Vº Bº de la Directora de Tesis

Dra. Almudena Porras Gallo

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de la Comunidad de Madrid mediante la concesión de una beca Predoctoral, al Ministerio de Sanidad mediante el proyecto FIS-PI041131, al Ministerio de Ciencia e Innovación mediante el proyecto FIS-PI070071, y a la financiación de la Comunidad de Madrid/Universidad Complutense de Madrid CAM/UCM 920384 (grupos de investigación de la UCM 06/07, 07/08, 08/09) y de la Universidad Complutense de Madrid UCM 920384 (grupos de investigación 09/10).

Agradecimientos

A mis hermanos

Dicen que esta, es la parte más difícil de escribir de la tesis, y es verdad. No soy muy dado a dejar aflorar mis sentimientos, pero en este caso, quería dedicar unas palabras a todo el mundo que habéis estado ahí durante esta etapa y de alguna manera me habéis ayudado a la realización de este trabajo. Espero incluiros a tod@s, si me olvido de alguien, mis disculpas de antemano.

Voy a empezar por agradecer a la responsable de todo esto, Almudena Porras, muchas gracias por toda la ayuda, comprensión, conocimientos.....desde luego sin ti esto no hubiera sido posible. A Carmen Guerrero, la que nos embarco en el mundo de C3G. También me gustaría agradecer a toda la gente del despacho, que desde luego me ha ayudado siempre (sobre todo en las raras ocasiones que mi jefa no estaba), gracias a Arantxa, a Marga y a Cesar y últimamente también a Cristina.

También quería agradecer a todos los profesores y/o miembros del departamento que de una manera u otra habéis contribuido en la realización de esta tesis: Manuel, Pilar, Carmen, la otra Carmen, Fernando, Marga, Pili, Elisa, María Jesús....y por supuesto a Lourdes.

Ahora ha llegado el momento de agradecer a tod@s mis compañer@s de trabajo que más cerca o más lejos habéis estado siempre ahí, ya sea ayudándome en una técnica, con unas palabras durante la comida o acompañándome con un cigarrillo.

Gracias a todos los del 15, antiguo y nuevo. A Carmencita, por ser como es....., a Oscar, mi Postdoc particular, siempre resolviendo dudas.... A Yoli, por todos los momentos que hemos disfrutado juntos, espero que nunca se acaben. A Carlos, un gran pozo de sabiduría. A Susana, quien me enseñó lo que sé. A Guedi, que en el fondo eres un cielo. A Ángela, la jefa del labo cuando llegué. Y más actualmente a Almudena, Gema, Silvia, Bea, Alberto y Nati. También quería recordar a toda la gente que ha pasado por este laboratorio: Rocío y María, mis predoc preferidas, Piedad mi segunda jefa, Rebeca, Andrea, Valeria y Belén. Por supuesto, un apartado especial para Isa, un poco “rara” al principio, pero siempre un encanto, aunque se metiese con mi forma de nombrar clones.

Gracias al labo de Cancer, a Alberto, mi otro postdoc, a Crisfri, por acogerme desde el principio, a Paloma la mas humilde y espontánea del departamento y por supuesto a Antonio, gracias por lo bien que te portaste conmigo en NY. A las de Hígado, Irene y Gaelle la pareja de cultivos 1, a Murillo, por ser todavía más cabezota que yo (y no es fácil) a Dora y su mundo, a Amileth Suárez, la colombiana más graciosa del departamento.

También recuerdo los buenos momentos y las cañas con las Margaritas, a Rocío y sus carcajadas, Iría la supermama, Sonia futura mama, María, Ana, Lucía, Elena y Loa.

De mi estancia en NY, quería recordar a Julio, mi segundo jefe (con el permiso de Almudena), A Paloma, posiblemente la mejor persona que he conocido en toda mi vida. A Carmen de España y Ole, por su simpatía. A “Gaiska”, un beliforano en NY, con el que espero pasar tan buenos momentos como los que pasé. A Carlitos, un alemán con acento sevillano. Y a todos los del laboratorio, Yeriel, Aparna, Denis, Yang, Álvaro y Francesca, Jons y por supuesto a Ajish. Un aviso, agarraos que creo que vuelvo para allá.

Aparte de mis compañeros del trabajo, también ha habido otra mucha gente detrás que han estado continuamente apoyándome y dándome ánimos (y aguantándome).

En especial, a Berta, por aguantarme estos dos años, y por estar dispuesta a seguirme sea donde sea, por apoyarme en mis días malos y animarme a continuar. Te doy las gracias por que una buena parte de esta tesis se debe a ti.

Gracias a mis hermanos Silvia y Borja, mis mecenas particulares. Tranquilos antes o después levantaremos cabeza y espero poder devolveros todo lo que habéis hecho por mí. Y también a tí Iñigo, espero podamos recuperar el tiempo perdido. (Nieves, tenemos un viaje pendiente a NY).

A mi “pequeña familia”, Guipu y sus manías, pero todo corazón. A Alfonso, el único responsable de la casa, a Nazabal y sus historias y en especial a Kiri por su gracia y....desparpajo, como solemos decir “un sinvergüenza, pero con clase”, sin olvidarme por supuesto de sus respectivas parejas. A Charly “The animal party” y a Lucía por estar siempre ahí (ve preparando el palabra de honor!).

También quería mandar un abrazo a Nuño y sus llamadas, a Juakolin por el “coteron” y a toda la pandilla de Charralandía.

A Chema, por instruirme en ciencia mucho antes de que todo esto empezara.

A toda la pandilla de Burgos Jordi, Juan, Paco, Jose, Miguel y Paula....y todos los demás.

En definitiva, gracias a todos, sin vosotros este trabajo no habría sido posible

Abreviaturas

4EBP-1:	del inglés “Eukaryotic translation initiation factor <u>4E</u> - <u>B</u> inding <u>P</u> rotein 1”
AIP:	del inglés “ <u>A</u> poptosis <u>I</u> nhibitor <u>P</u> rotein”
Akt:	del inglés “ <u>A</u> K strain <u>T</u> ransforming; v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AMPK:	del inglés “ <u>A</u> MP-activated proteína <u>K</u> inase”
Apaf-1:	del inglés “ <u>A</u> poptotic <u>P</u> rotease <u>A</u> ctivating <u>F</u> actor 1”
ASK1:	del inglés “ <u>A</u> poptosis <u>S</u> ignal <u>R</u> egulating <u>K</u> inase”
Asp:	Aspártico
ATF1:	del inglés “ <u>A</u> ctivating <u>T</u> ranscription <u>F</u> actor 1”
ATM:	del inglés “ <u>A</u> taxia <u>T</u> elangiectasia <u>M</u> utated”
Bad:	del inglés “ <u>B</u> CL2-associated <u>A</u> gonist of cell <u>D</u> eath”
Bax:	del inglés “ <u>B</u> CL2- <u>A</u> ssociated <u>X</u> protein”
Bcl-2:	del inglés “ <u>B</u> - <u>C</u> ell leukemia/ <u>L</u> ymphoma 2”
Bcl-X_L:	del inglés “ <u>B</u> - <u>C</u> ell <u>L</u> ymphoma- <u>E</u> xtra <u>L</u> arge”
BH2/3:	del inglés “ <u>B</u> cl-2 <u>H</u> omology”
Bid:	del inglés “ <u>B</u> H3 <u>I</u> nteracting <u>D</u> omain death agonist”
BSA:	albúmina de suero bovina
BNIP-3:	del inglés “ <u>B</u> CL2/adenovirus E1B <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein 2”
C3G:	del inglés ““ <u>C</u> rk <u>S</u> H3 <u>d</u> omain-binding <u>G</u> uanine nucleotide exchange factor”
Cdc42:	del inglés “ <u>C</u> ell <u>D</u> ivision <u>C</u> ontrol protein 42 homolog”
CDK:	quinasa dependiente de ciclinas
CK1:	del inglés “ <u>C</u> asein <u>K</u> inase 1”
CHAPS:	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonato
CHOP:	del inglés “ <u>C</u> /EBP <u>H</u> omologue <u>P</u> rotein”
COX2:	del inglés “ <u>C</u> yclooxygenase-2
CREB:	del inglés “ <u>c</u> -Amp <u>R</u> esponse <u>E</u> lement- <u>B</u> inding”
DNA :	Ácido desoxirribonucleico
DCFH:	Diacetato de 2’7-di-clorofluoresceína
DED:	del inglés “ <u>D</u> eath <u>E</u> ffector <u>D</u> omain”
DISC:	del inglés “ <u>D</u> eath- <u>I</u> nducing <u>S</u> ignal <u>C</u> omplex”
DLK/MUK/ZPK:	del inglés “ <u>D</u> ual <u>L</u> eucine <u>Z</u> ipper bearing <u>K</u> inase”
DMEM:	del inglés “ <u>D</u> ubelco <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium”
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DNAc:	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNAPK:	del inglés “DNA <u>P</u> rotein <u>K</u> inase”
DR:	del inglés “ <u>D</u> eath <u>R</u> eceptor”
EDTA:	ácido etilendiaminotetracético
EGTA:	glicol-bis(2-aminoetileter)-ácido N,N,N’-tetraacético
EGF:	del inglés “ <u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor”
ERKs:	del inglés “ <u>E</u> xtracellular <u>S</u> ignals <u>R</u> egulated <u>K</u> inases”
FADD:	del inglés “ <u>F</u> as- <u>A</u> ssociated <u>D</u> eath <u>D</u> omain”
FBS:	suero fetal bovino
FGF:	del inglés “ <u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor”.
FITC:	Fluoresceína.
Foxo:	del inglés “ <u>F</u> orkhead <u>B</u> ox 0”
GDI:	del inglés “guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor”
GDP:	Guanosin-di-fosfato
Gly:	Glicina

GM-CSF:	del inglés “ <u>G</u> ranulocyte <u>M</u> acrophage <u>C</u> olony <u>S</u> timulating- <u>F</u> actor”
GMP:	Guanosin-mono-fosfato
GPI:	Glucosil-fosfatidil-inositol
GST:	del inglés “ <u>G</u> lutation <u>S</u> -transferasas”
GSK3:	del inglés “ <u>G</u> lycogen <u>S</u> ynthase <u>K</u> inase 3”
GTP:	Guanosin-tri-fosfato
HDL:	del inglés “ <u>H</u> igh <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein”
HIF:	del inglés “ <u>H</u> ypoxia <u>I</u> nducible <u>F</u> actor”
HO-1:	hemo-oxigenasa-1
HOG-1:	proteína de levaduras homologa a p38 MAPK de mamíferos
Hsp27:	del inglés “ <u>H</u> eat <u>S</u> hock <u>P</u> rotein 27” <u>K</u> inase 2”
IC:	Concentración inhibitoria
IKK:	del inglés “inhibitor of kappaB”
IL1/IL3:	Interleuquina 2/3
iNOS:	del inglés “ <u>i</u> nducible <u>N</u> itric <u>O</u> xide <u>S</u> ynthase”
IP:	Ioduro de propidio
Jak:	quinasas Janus
JNKs:	del inglés “c- <u>J</u> un <u>N</u> -terminal <u>K</u> inases”
KDa:	Kilodaltons
LKB:	
LPS:	lipopolisacárido
Lys:	lisina
MEFs:	fibroblastos embrionarios de ratón
MAPK:	del inglés “ <u>M</u> itogen <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inases”
MEFs:	fibroblastos embrionarios de ratón
MEF2:	del inglés <u>M</u> yocyte <u>E</u> nhancer <u>F</u> actor 2”
MEK5:	del inglés “ <u>M</u> itogen <u>E</u> xtracellular signal-regulated <u>K</u> inase-5”
MEKK1:	del inglés “ <u>M</u> EK kinase 1”
MEKK4:	del inglés “ <u>M</u> EK <u>K</u> inase 4”
MK2/MAPKAP-K2:	del inglés “ <u>M</u> APK-Activated Protein Kinases 2”
MLK:	del inglés “ <u>M</u> ixed <u>L</u> ineage <u>K</u> inase ”
MKK:	del inglés “ <u>M</u> APK <u>K</u> inases <u>K</u> inases
MKP:	del inglés “ <u>M</u> AP <u>K</u> inase <u>P</u> hosphatases”
Mn:	Manganeso
MNK1:	del inglés “MAP Kinase Interaction Protein Kinase”
mTOR:	del inglés “ <u>m</u> ammalian <u>T</u> arget <u>O</u> f <u>R</u> apamycin”
MSK:	del inglés “ <u>M</u> itogen and <u>S</u> tress activated <u>K</u> inase”
NGF:	del inglés “ <u>N</u> erve <u>G</u> rowth <u>F</u> actor”
NO:	óxido nítrico
NOS:	del inglés “ <u>N</u> itric <u>O</u> xide <u>S</u> ynthase”
Nox:	NADPH oxidasa:
NP-40:	Nonidet P -40.
NQO1:	del inglés “ <u>N</u> AD(P)H Quinone <u>O</u> xidoreductase 1”
p70S6K:	del inglés “ribosomal protein <u>S</u> 6 <u>K</u> inase”
PAK:	del inglés “p-21 <u>A</u> ctivated <u>K</u> inase”
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	del inglés “ <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction”
PDGF:	del inglés “ <u>P</u> latelet <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor”
PFA:	Paraformaldehído
PI3K:	del inglés “ <u>P</u> hosphatidylinositol 3- <u>K</u> inase”

PIP:	del inglés “ <u>P</u> hosphatidyl <u>I</u> nositol- <u>P</u> hosphate”
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP2A:	del inglés “ <u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase <u>2A</u> ”
PTP:	del inglés “ <u>P</u> hosphatasa <u>T</u> yrosine <u>P</u> rotein”
PRAK:	del inglés “ <u>p</u> 38 <u>R</u> egulated <u>A</u> ctivated <u>K</u> inase”
Ras:	del inglés “ <u>R</u> At <u>S</u> arcoma virus”
Rac:	del inglés “ <u>R</u> As-related <u>C</u> 3 botulinum toxin”
Rap:	del inglés “ <u>R</u> As-related <u>P</u> rotein”
RE:	retículo endoplasmático
Rheb:	del inglés “ <u>R</u> as <u>H</u> omolog <u>E</u> nriched in <u>B</u> rain”
Rho:	del inglés “ <u>R</u> as <u>H</u> omolog”
RNA:	Ácido ribonucleico
RNA_m:	Acido ribonucleico mensajero
ROS:	especies reactivas de oxígeno
r.p.m.:	revoluciones por minuto.
SB:	SB302580: inhibidor de la p38α/β
SCO2:	subunidad citocromo c oxidasa 2
SDS:	dodecil sulfato sódico
S.E.M:	error estandar de medida
Ser:	serina
SH3:	del inglés “ <u>S</u> rc <u>H</u> omology 3”
SOD:	súper oxido dismutasa
Sox-2:	Gen 2 con dominios HMG similares al del gen SRY
STAT3:	del inglés “ <u>S</u> ignal <u>T</u> ransducer and <u>A</u> ctivator of <u>T</u> ranscription 3”
TAB-1:	del inglés “ <u>T</u> AK-1-Binding protein
TAK-1:	del ingles “ <u>T</u> ransforming growth factor-b- <u>A</u> ctivated protein <u>K</u> inase1”
TCR:	del inglés “ <u>T</u> <u>C</u> ell <u>R</u> eceptor”
Thr:	treonina
TNFα,	del inglés ” <u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor alpha”
TRAIL:	del inglés “ <u>T</u> umor necrosis (TNF)- <u>R</u> elated <u>A</u> poptosis- <u>I</u> nducing <u>L</u> igand”
TRITC:	del inglés “ <u>T</u> etramethyl <u>R</u> hodamine <u>I</u> so- <u>T</u> hiocyanate”
Trx:	Thioredoxina
TSC:	del inglés “ <u>T</u> uberous <u>S</u> clerosis”
Tween 20:	nombre comercial de polioxietilensorbitan monolaurato
Tyr:	tirosina
(v/v):	volumen/volumen.
UPAR:	del inglés “ <u>U</u> rokinase <u>P</u> laminogen <u>A</u> ctivator <u>R</u> eceptor”
UV:	ultravioleta
VIP:	del inglés “ <u>V</u> asoactive <u>I</u> ntestinal <u>P</u> olypeptide”
WASP:	del inglés “ <u>W</u> iskott- <u>A</u> ldrich <u>S</u> ndrome <u>P</u> rotein”
WAVE:	del inglés “ <u>W</u> ASP-family <u>V</u> erprolin-homologous proteína”

Índice

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

INTRODUCCIÓN	1
1. Superfamilia de las MAPKs	1
2. Subfamilia de las p38 MAPKs:	3
2.1. Generalidades	3
2.2. Funciones de las p38 MAPKs	6
3. Papel de las p38 MAPKs en la apoptosis:	9
3.1. Apoptosis: Generalidades	9
3.2. p38 MAPKs y apoptosis	13
4. Rutas de supervivencia: PI3K/Akt/mTOR	14
5. Caveolas y caveolinas:	18
5.1. Generalidades	18
5.2. Funciones de las caveolas y caveolinas	22
6. Familia de proteínas G de bajo peso molecular de la subfamilia de Rho/Rac:	24
6.1. Generalidades	24
6.2. Proteínas Rac:	26
6.2.1. Generalidades	26
6.2.2. Función	27
6.2.3. Regulación	29
6.2.4. Papel de Rac en la regulación de las p38 MAPKs	30
7. C3G:	31
7.1. Generalidades	31
7.2. Estructura	33
7.3. Rutas de transducción de señales reguladas por C3G	34
7.4. Interacciones con otras proteínas	37

7.5. Funciones de C3G y/o Rap-1:	40
7.5.1. Adhesión, interacciones célula-célula y migración celular	40
7.5.2. Apoptosis y supresión tumoral	41
8. Especies reactivas de oxígeno:	42
8.1. Papel de las especies reactivas de oxígeno en los procesos de apoptosis	45
8.2. Papel de las especies reactivas de oxígeno en cáncer	46
ANTECEDENTES DEL GRUPO	47
OBJETIVOS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	55
1. Obtención y cultivo de las diferentes líneas celulares	55
2. Tratamientos celulares:	57
2.1. Estímulos de estrés y/o apoptóticos	57
2.2. Estímulos de supervivencia	58
2.3. Inhibidores de diferentes vías de señalización	58
3. Congelación, descongelación y mantenimiento de las líneas celulares	58
4. Preparación de extractos	59
5. Determinación de la concentración de proteínas	59
6. Análisis de proteínas por Western-Blot e inmunodetección	60
7. Borrado de membranas de nitrocelulosa	63
8. Inmunoprecipitación	63
9. Ensayos de la actividad de proteínas:	64
9.1. Determinación de la actividad de Rap-1	64
9.2. Medida de la actividad de Rac-1	66
9.3. Medida de la actividad de MK-2	66
10. Análisis por microscopía de fluorescencia y/o confocal de la localización subcelular de proteínas	68
11. Medida de especies reactivas de oxígeno	69

12. Técnicas para detectar muerte celular y/o apoptosis:	70
12.1. Medida de la viabilidad celular por cristal violeta	70
12.2. Análisis del contenido en DNA por citometría de flujo	70
12.3. Medida de la condensación y/o fragmentación de los núcleos mediante microscopía de fluorescencia tras tinción con yoduro de propidio	71
13. Ensayos de adhesión celular	72
14. Aislamiento del DNA total de las células en cultivo y genotipaje de las células deficientes en C3G	72
15. Aislamiento del RNA total de las células en cultivo:	74
15.1. RT-PCR semicuantitativa	75
16. Análisis de la expresión génica diferencial utilizando arrays de DNA	75
17. Obtención de DNA plasmídico para transfección:	76
17.1. Transformación de bacterias competentes	76
17.2. Crecimiento bacteriano, extracción y purificación del DNA plasmídico	76
17.3. Transfección de células eucariotas:	77
17.3.1. Método del fosfato cálcico	77
17.3.2. Método de análogos de lipofectamina	78
17.3.3. Construcciones utilizadas	78
RESULTADOS	78
1. p38 α MAPK regula positiva o negativamente la actividad de Rac-1 dependiendo de la presencia de suero:	81
1.1. La activación de Rac-1 en células mantenidas sin suero depende de p38 α y de adhesión.	81
1.2. p38 α regula negativamente la actividad de Rac-1 en presencia de suero	85

1.3. Regulación de la localización subcelular de Rac-1 y caveolina-1 y de la actividad de Rac-1 por cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por la ausencia de suero y mediados por p38 α	88
1.4. p38 α regula la adhesión celular a través de Rac-1	91
2. C3G regula negativamente a p38 MAPK en respuesta a estrés por un mecanismo independiente de Rap-1: papel en la muerte celular:	93
2.1. C3G regula negativamente la actividad de p38 α MAPK en respuesta a estrés	94
2.2. La regulación de p38 α MAPK por C3G no está mediada por Rap-1	97
2.3. Regulación de la muerte celular por C3G/p38 α MAPK y Rap-1	99
2.4. Regulación de proteínas de la familia Bcl-2 por C3G y Rap-1 a través de mecanismos dependientes e independientes de p38 α MAPK	104
3. p38 α MAPK desempeña una función dual en la regulación de la muerte celular inducida por estrés oxidativo:	108
3.1. p38 α MAPK induce supervivencia en respuesta a estrés oxidativo	108
3.2. Papel de MKK3/6 en la muerte celular por estrés oxidativo	110
3.3. p38 α MAPK regula la activación de la ruta de supervivencia mTOR/p70S6K en respuesta a estrés oxidativo	112
3.4. La activación de la ruta mTOR/p70S6K mediada por p38 α MAPK en respuesta al tratamiento con H ₂ O ₂ no se correlaciona con la activación de Akt o de AMPK	113
3.5. La Rapamicina no sensibiliza a las células que expresan p38 α a la muerte celular en respuesta al estrés oxidativo	115
3.6. p38 α MAPK protege frente a la muerte inducida por H ₂ O ₂ mediante la expresión de proteínas de defensa frente al estrés oxidativo	117

DISCUSIÓN	121
1. p38 α MAPK regula positiva o negativamente la actividad de Rac-1 dependiendo de la presencia de suero	121
2. C3G regula negativamente a p38 MAPK en respuesta a estrés por un mecanismo independiente de Rap-1: papel en la muerte celular	127
3. p38 α MAPK desempeña una función dual en la regulación de la muerte celular inducida por estrés oxidativo	133
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA	141
ANEXO I: Arrays de expresión	157
ANEXO II: Publicaciones	

Introducción

1. SUPERFAMILIA DE LAS MAPKs

Las células responden a los cambios físicos y químicos de su medio ambiente alterando muchas funciones celulares tales como la supervivencia, proliferación, metabolismo, interacciones con otras células y numerosos procesos celulares involucrados en la regulación de la homeostasis del organismo. Para detectar estos cambios y coordinar la respuesta correcta, las células de mamíferos activan a miembros de la superfamilia de MAP quinasas, MAPK (“Mitogen Activated Protein Kinases”) (revisado por Nebreda y Porras 2000; Cuenda y Rousseau 2007). Las MAPKs son una superfamilia de serina-treonina quinasas altamente conservadas a lo largo de la evolución, que se encargan de transmitir las señales generadas por distintos estímulos como factores de crecimiento, citoquinas o estrés, desde la membrana de la célula hasta el citosol y/o el núcleo. De esta forma, regulan una serie de funciones celulares como son la proliferación, apoptosis, diferenciación y respuesta al estrés. Se activan por fosforilación dual en una treonina y una tirosina gracias a la activación de una cascada de fosforilaciones (Cohen et al. 1997; English et al. 1999). Presentan un dominio altamente conservado de fosforilación en el subdominio VIII, Thr-X-Tyr. Las proteínas quinasas encargadas de la activación se engloban dentro del grupo de las MAPK quinasas (o MAPKK) y son específicas para distintos miembros de la familia de MAPKs, aunque algunas se comparten.

La superfamilia de las MAPKs puede, a su vez, subdividirse en varias familias:

- ERKs (“Extracellular Signals Regulated Kinases”): activadas en respuesta a factores de crecimiento y otras señales extracelulares, regulan procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis. Se activan por MEK 1/2 (revisado por Raman et al. 2007).

- MAPKs de estrés, que engloban a dos familias:

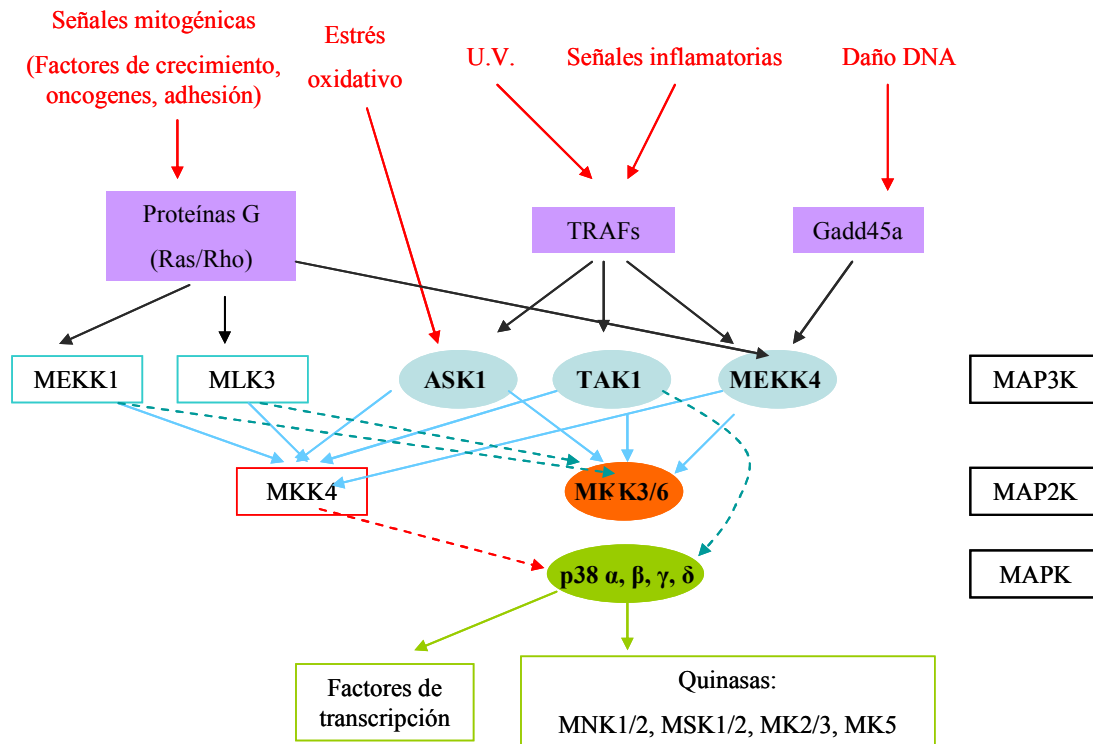
 - ⇒ Subfamilia de las JNKs (“c-Jun N-terminal Kinases”). Activadas por MKK 4/7 (revisado por Weston y Davis 2007).

 - ⇒ Subfamilia de las p38 MAPKs. Son activadas por MKK3/6/4 (revisado por Cuenda y Rousseau 2007; Raman et al. 2007).

- Familia de ERK5, juega un papel en el músculo y se activa por MEK5 en respuesta a EGF.

- Familia de las MAPK atípicas, englobaría MAPK menos conocidas: Familia ERK3/4, NLK, ERK7, ERK8 (revisado por Bogoyevitch y Court 2004; Coulombe y Meloche 2007).

Figura 1: Ruta general de activación de las MAPKs



Diferentes tipos de estímulos procedentes de señales mitogénicas, estrés oxidativo, radiación UV, señales proinflamatorias o daño en el DNA, resultan en la activación de las MAP3K. Las MAP3K activan a las MAP2K, las cuales, activan a las p38MAPK. Una vez activadas, las p38 MAPKs fosforilan multitud de sustratos, como otras proteínas quinasas y factores de transcripción. Las líneas continuas indican interacciones bien establecidas y corroboradas "in vivo", las líneas discontinuas indican interacciones determinadas "in vitro" no suficientemente comprobadas in vivo.

ERK1/2 fueron los primeros miembros identificados de esta superfamilia. Se encuentran entre las proteínas quinasas más frecuentemente activadas por señales extracelulares de distinto tipo. Esto se debe principalmente a su amplia expresión en distintos tejidos y al hecho de que su ruta de activación esté muy conservada. Se describieron por primera vez como proteínas quinasas activadas por insulina y mediadoras de proliferación (Boulton y Gokal 1990). Posteriormente, se han relacionado con múltiples estímulos y funciones celulares (English y Cobb 2002). En primer lugar, se aisló la ERK1 y posteriormente se aisló la ERK2, ambas como proteínas quinasas activadas en respuesta a insulina, que presentan un 90% de

homología en sus secuencias. Se activan mediante fosforilación en un residuo de Tyr y otro de Thr. Presentan diferentes funciones, entre las que cabe destacar la regulación de la proliferación celular.

2. SUBFAMILIA DE LAS p38MAPKs

2.1 Generalidades

Las p38MAPKs pueden ser activadas en respuesta a una gran variedad de estímulos de estrés (cambios en la osmolaridad, radiación UV, estrés oxidativo, etc) y citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α o IL1). No obstante, también pueden ser activadas por otros tipos de estímulos, incluidos los factores de crecimiento. Regulan numerosas funciones celulares como son la respuesta al estrés, apoptosis, proliferación, diferenciación, migración y otros procesos implicados en el desarrollo (revisado por Nebreda y Porras 2000; Ono y Han 2000). Su activación se induce mediante la fosforilación de la secuencia Thr-Gly-Tyr, que está altamente conservada, incluso en su homólogo de *S. cerevisiae*, HOG1 (p38 MAPK osmosensible) (Brewster et al. 1993).

La familia de las p38MAPKs está constituida por cuatro isoformas distintas: p38 α , β , γ y δ . Todas ellas tienen más de un 60% de homología. p38 α se identificó inicialmente como una proteína de 38KDa que era rápidamente fosforilada en Tyr en respuesta al tratamiento con endotoxina bacteriana (lipopolisacárido o LPS) en macrófagos (Han et al. 1994). En paralelo, otros dos grupos identificaron a p38 α como una quinasa activada por estrés e IL1, que podía fosforilar directamente y activar a la MAPKAP-K2 (“MAPK-Activated Protein Kinases 2”) (Freshney et al. 1994; Rouse et al. 1994). Por último, ese mismo año, el cDNA de p38 α fue clonado y se identificó p38 α como una proteína que interaccionaba con derivados químicos de los pirimidil imidazoles, que inhibían la producción de citoquinas pro-inflamatorias por los monocitos (Lee et al. 1994). Posteriormente, se identificaron otras 3 isoformas, p38 β (Jiang et al. 1996), p38 γ (Li et al. 1996) y p38 δ (Goedert et al. 1997; Jiang et al. 1997).

La p38 α es la isoforma más ubicua y de mayor expresión, la p38 β también se expresa en la mayoría de los tejidos, aunque sus niveles suelen ser mucho menores que los de p38 α . Por el contrario, la p38 γ se expresa preferentemente en músculo

esquelético y la p38 δ en los pulmones, testículos, páncreas e intestino delgado (Goedert et al. 1997; revisado por Nebreda y Porras 2000; Cuenda y Rousseau 2007).

La cinética y los niveles de activación de las cuatro isoformas varían en respuesta a diferentes estímulos, lo que sugiere que estas isoformas están específicamente reguladas a través de sus distintos activadores. De hecho, aunque la MKK6 es capaz de fosforilar a las 4 isoformas, la MKK3 tiene una especificidad más restringida y sólo es capaz de fosforilar a p38 α , γ y δ , mientras que la MKK4 sólo fosforila a p38 α y p38 δ (revisado por Tanaka et al. 2002). Además, se han descubierto dos mecanismos de activación por autofosforilación independientes de la activación por las MKKs. El primero de ellos está regulado por la unión de TAB-1 (“Transforming growth factor- β -activated protein kinase-1 (TAK-1)-Binding protein”) con p38 α (Ge et al. 2002; Li et al. 2005). Otro mecanismo de activación de p38 α independiente de las MKKs en las células T activadas por el receptor de célula T (TCR) implica la fosforilación de p38 α en un residuo no canónico (Tyr 323) (Salvador et al. 2005).

Muchos de los datos disponibles sobre las p38 MAPKs se han obtenido mediante el uso de inhibidores químicos de la p38 α y β , como el SB203580 y el SB202190. Estos inhibidores interaccionan con la Thr-106 de la zona de unión al ATP, impidiendo su unión al ATP. Debido a que los valores de IC₅₀ para ambas isoformas son bastante similares, no siempre es posible diferenciar entre los efectos de cada una de ellas (Godl et al. 2003). Estos problemas han sido parcialmente solucionados gracias a la generación de ratones deficientes en p38 α , aunque estos ratones mueren en la mitad del desarrollo embrionario (Adams et al. 2000; Mudgett et al. 2000). Recientemente, también se han obtenido ratones deficientes en p38 β , p38 γ y p38 δ y doble para p38 γ /p38 δ (Beardmore et al. 2005; Sabio et al. 2005). Estos ratones son viables y fértiles y constituyen una potente herramienta para identificar el papel fisiológico y los posibles sustratos de esta isoforma de p38 (revisado por Aouadi et al. 2006a).

El uso de todas estas herramientas ha permitido la descripción de numerosos procesos regulados por las p38 MAPKs. Así, se ha descrito que p38 α se activa en procesos relacionados con la inflamación, como por ejemplo en la estimulación de macrófagos con LPS (Han et al. 1994) y en la estimulación de células endoteliales con TNF- α (Modur et al. 1996). p38 también puede ser activada por otras muchas señales como GM-CSF, FGF, eritropoyetina, IL-3, EGF, NGF o PDGF en distintos tipos

celulares (revisado por Nebreda y Porras 2000; Ono y Han 2000). Así mismo, se activa por algunos agentes quimioterapéuticos como el cisplatino (Bragado et al. 2007), y en respuesta a señales de estrés como la radiación UV o el estrés oxidativo (revisado en Ono y Han 2000). La activación de p38 no sólo depende del estímulo, sino también del tipo celular.

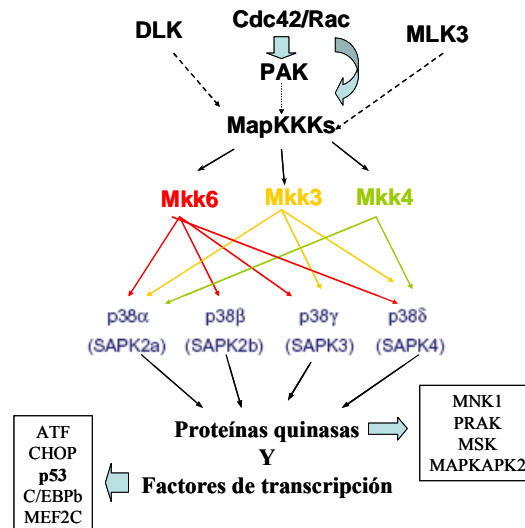
Las rutas de transducción de señales que regulan la(s) cascada(s) de las p38 MAPKs son muy diversas, lo que explica en parte que p38 pueda ser activada por muchos estímulos. Se ha descrito que las MAPK quinasa quinasas (MAP3K) son capaces de activar a las MKKs, regulando las rutas de las p38 y JNKs (figura 1). Algunas proteínas G de bajo peso molecular, como por ejemplo Rho, Rac y Cdc42 pueden regular la ruta de p38 a través de la interacción con algunas MAP3K (MLK1, 2, 3) y/o con las PAKs (“p21 Activated Kinases”) (Ono y Han 2000).

En condiciones fisiológicas, la activación de las p38MAPKs suele ser transitoria, y los niveles totales de proteína no cambian a lo largo del curso de la estimulación, por lo que, la inactivación se produce por desfosforilación. Se ha descrito un grupo de fosfatasas duales, las MKP-1, MKP-4 y MKP-5 (“MAP Kinase Phosphatases”) que son capaces de desfosforilar a las p38 α y β . Las p38 γ y δ parecen ser resistentes a la acción de todos los miembros de la familia de las MKPs. Dichas MKPs son inducibles en respuesta a estímulos mitogénicos o de estrés, excepto la MKP-3 cuya expresión es constitutiva y está regulada por interacciones proteína-proteína con ERK2. Además, hay familias de Tirosina fosfatasas (PTPs), y de Serina/Treonina fosfatasas, como la PP2C, que pueden jugar un papel en la inhibición de las p38 MAPKs. Hay evidencias de que la PP2C α regula negativamente a las MKK6 y MKK4, tanto *in vivo* como *in vitro* (revisado por Ono y Han 2000; Zarubin y Han 2005; Cuenda y Rousseau 2007).

El primer sustrato de p38MAPK identificado, fue la MAPKAPK2 (“MAP Kinase-Activated Protein Kinase 2”) o MK-2, que puede ser fosforilada y activada por p38 α y β , tanto *in vivo* como *in vitro* (Rouse et al. 1994). La proteína MAPKAPK-3 o MK3 es también sustrato de estas isoformas. Además, existen otras quinasas que también son sustratos de p38 como MNK1 (“MAP Kinase Interaction Protein Kinase”), PRAK (“p38 Regulated Activated Kinase”) y MSK (“Mitogen and Stress activated Kinase”). Una vez activadas, estas quinasas fosforilan otras proteínas o factores de transcripción amplificando y diversificando la señal transmitida por p38. Del mismo modo, p38 α y β también pueden fosforilar y activar factores de transcripción como

ATF-1/2, CHOP (“C/EBP Homologue Protein”), p53, MEF2C (Myocyte Enhancer Factor 2C”) y MEF2A (Myocyte Enhancer Factor 2A”), entre otros. Además, también han sido identificados como sustratos de p38 α y β algunas proteínas del citoesqueleto, componentes de la maquinaria transcripcional y enzimas metabólicas tales como la glucógeno sintasa o la fosfolipasa A2 (revisado por Zarubin y Han 2005).

Figura 2: Ruta de activación de las p38 MAPKs



Las p38MAPKs son activadas por fosforilación principalmente por las quinasas MKK6 y MKK3. Como sustratos tienen a multitud de moléculas, entre las que se encuentran proteínas quinasas y factores de transcripción.

2.2 Funciones de las p38 MAPKs

La diversidad de sustratos y de rutas que regulan las p38 MAPKs sugiere que pueden estar implicadas en la regulación de una gran variedad de funciones biológicas. Se ha visto que participa en la regulación de muchos procesos celulares:

1. **Inflamación:** La activación de la ruta de las p38 MAPKs es esencial en la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Shapiro y Dinarello 1995; Beyaert et al. 1996). Además, p38 induce la expresión de las enzimas COX2 (“Cyclooxygenase-2”) (Guan et al. 1998) e iNOS (“inducible Nitric Oxide Synthase”) (Badger et al. 1998) y juega un papel primordial en la diferenciación y proliferación de células del sistema inmune (Kummer et al. 1997).

2. **Diferenciación:** Las p38 α/β son mediadoras de la diferenciación en algunos tipos celulares como puede ser la diferenciación de las células PC12 a neuronas y la de las células SKT6 a eritrocitos, así como el paso de mioblastos a miotubos de las células C2C12 (revisado por Cuenda y Cohen 1999; Nebreda y Porras 2000).
3. **Desarrollo:** Las p38 MAPKs también juegan un papel relevante en el desarrollo, como por ejemplo en la regulación de la morfogénesis del ala y en el correcto desarrollo de la asimetría del huevo en Drosophila (revisado por Nebreda y Porras 2000). De todas las isoformas, p38 α parece ser la única que juega un papel relevante durante el desarrollo embrionario en mamíferos, puesto que los ratones deficientes en p38 α mueren en el día 10.5 ó 13.5 del desarrollo como consecuencia de un defecto en la placenta que secundariamente causa alteraciones cardíacas o anemia, respectivamente (Adams et al. 2000; Tamura et al. 2000). Los estudios con estos ratones han puesto de manifiesto que p38 α está implicada en la angiogénesis de la placenta (Mudgett et al. 2000) y en la eritropoyesis (Tamura et al. 2000).
4. **Ciclo celular/proliferación:** El papel de p38 en la regulación del ciclo celular no está del todo claro. En algunos tipos celulares parece inducir proliferación, como en Swiss 3T3 o FD-EPO, mientras que en otros muchos la inhibe (como en NIH3T3 y CCL39) (revisado por Nebreda y Porras 2000). Se han descrito distintos mecanismos a través de los cuales p38 controla la parada del ciclo celular, que incluyen la regulación de proteínas implicadas tanto en la transición de la fase G1/S como G2/M. De acuerdo con todo esto, p38 MAPK regula negativamente la actividad de CDK4 a través de la inhibición de la ciclina D1 y/o de la regulación positiva del inhibidor p16INK4. Por otro lado, la atenuación de la señal de la CDK2, está mediada por p38 a través de la regulación negativa de las fosfatasa CDC25A, B y C (revisado por Bulavin y Fornace 2004).
5. **Apoptosis:** Dependiendo del tipo celular, del estímulo y de la isoforma, las p38 MAPKs pueden mediar apoptosis o inducir supervivencia celular como se comentará con más detalle a continuación.

6. **Migración:** La ruta de p38MAPKs puede mediar procesos de migración. Estudios usando células derivadas de ratones deficientes para las distintas isoformas de p38 han puesto de manifiesto que p38 α es la única isoforma implicada en la transducción de señales quimiotácticas (revisado por Cuenda y Rousseau 2007). Así la activación de p38 inducida por la expresión de un mutante activo de MKK6 es suficiente para inducir migración de células endoteliales, a través de la fosforilación de Hsp27 y la formación de lamelipodios (revisado por Bulavin y Fornace 2004). De hecho, la p38 α sería la mediadora de estos efectos (McMullen et al. 2005).

7. **Adhesión:** Las p38 MAPKs regulan la polimerización-despolimerización de la actina y la expresión de algunas moléculas de adhesión (Laferriere et al. 2002). Además, en células embrionarias de ratón progenitoras, se ha demostrado que la ausencia de p38 α favorece la adhesión (Guo y Yang 2006).

8. **Senescencia:** Las p38 MAPKs parecen jugar un papel en la inducción de senescencia en algunos tipos celulares como en las células de osteosarcoma (McMullen et al. 2005). A su vez, la senescencia inducida en respuesta a un acortamiento de los telómeros, al estrés oxidativo o a la activación crónica de H-Ras está mediada por la activación de la ruta de p38 α/β MAPK (Haq et al. 2002; Bihani et al. 2004).

9. **Cáncer:** Clásicamente se ha descrito a la p38 α como una proteína con funciones antitumorales, debido a su capacidad de inducir apoptosis. Así, por ejemplo, se ha demostrado que la p38 α puede regular negativamente la iniciación de tumores incrementando los niveles de apoptosis en respuesta a la producción de ROS inducida por determinados oncogenes como H-ras (Dolado et al. 2007). Nuestro grupo también demostró la importancia de la estimulación de la cascada p53/ROS/p38 α MAPK para la inducción de la muerte celular inducida por cisplatino en células de carcinoma de colon HCT116 (Bragado et al. 2007).

3. PAPEL DE LAS p38 MAPKs EN LA APOPTOSIS

Como hemos mencionado anteriormente, las p38 MAPKs pueden estar implicadas tanto en la inducción de apoptosis como de supervivencia celular. El papel de las p38 MAPKs en la apoptosis es dependiente del tipo celular, estímulo e isoforma de p38 activada.

3.1 Apoptosis: Generalidades

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada caracterizada por la condensación de la cromatina y del citosol, fragmentación del DNA y de la célula formándose finalmente cuerpos apoptóticos que son eliminados por fagocitosis sin que se produzca inflamación. Por el contrario, en la muerte por necrosis se produce un hinchamiento celular y posterior fragmentación, liberándose el contenido celular, lo que origina un proceso de inflamación (revisado por Kroemer et al. 2005).

La apoptosis tiene una importancia fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, ya que elimina las células que están en exceso o que son potencialmente peligrosas, y juega un papel esencial en el desarrollo al eliminar células o tejidos transitorios (revisado por Kroemer et al. 2005). En la mayoría de los casos, la ejecución de la apoptosis se debe a la activación de un conjunto de cisteín-proteasas denominadas caspasas que se activan en cascada. Todas las caspasas conocidas tienen una cisteína en su centro activo y producen cortes en proteínas con la secuencia Asp-X detrás del Asp.

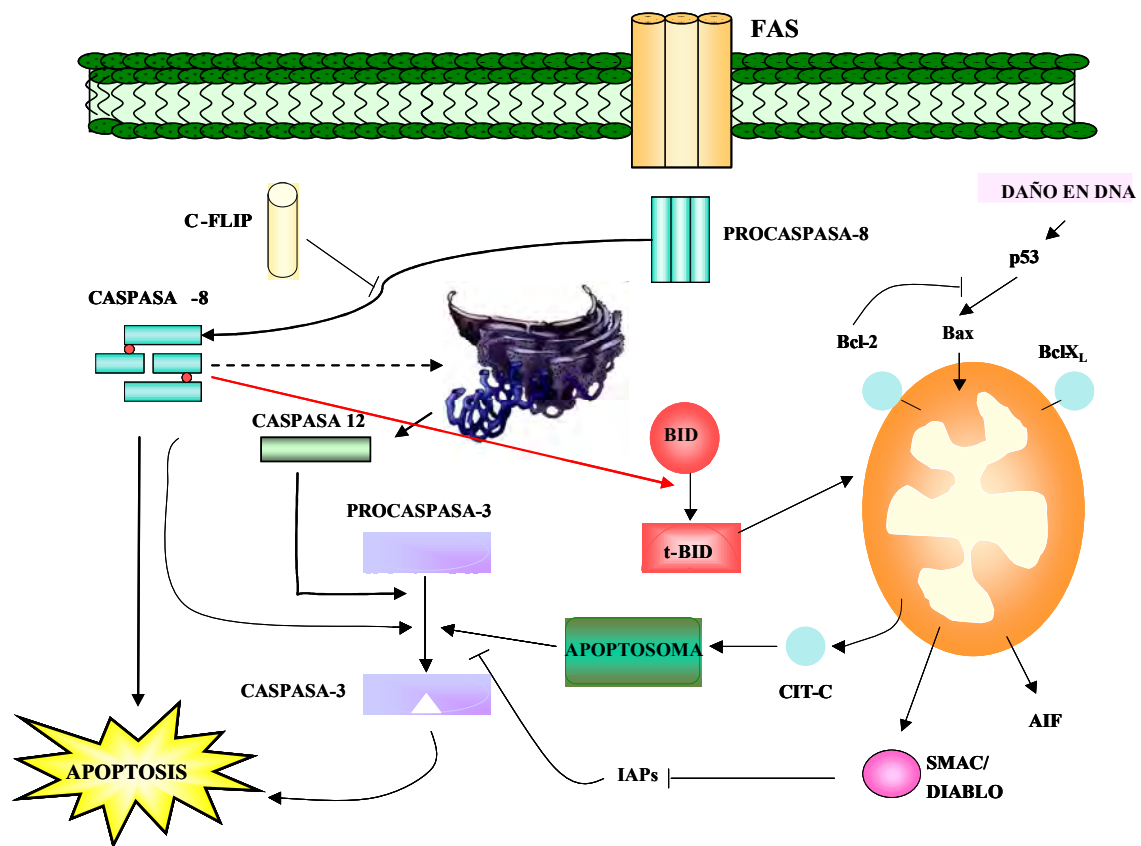
Existen tres rutas de inducción de apoptosis: la vía de los receptores de muerte, la vía mitocondrial y la ruta del retículo endoplasmático, que en muchos casos convergen en la mitocondria.

- **Ruta extrínseca o de los receptores de muerte.** Está mediada por receptores de membrana que presentan un dominio de muerte, tales como CD-95 (FAS), receptor de TNF α (“Tumor Necrosis Factor-alpha”) o TRAIL (“TNF α -Related Apoptosis-Inducing Ligand”). La unión del ligando al receptor induce la oligomerización del receptor y la formación del complejo inductor de muerte (DISC), que interacciona con el dominio efector de muerte (DED) de la procaspasa 8 (Fig 3). El resultado es la activación de la caspasa 8, gracias a la formación de un heterotetrámero, que consta de dos subunidades grandes y dos pequeñas, que activa a la procaspasa 3, lo cual, conduce a la ejecución del programa de muerte celular (Hengartner 2000; Krammer 2000).

- **Ruta intrínseca o mitocondrial.** Está regulada por proteínas de la familia de Bcl-2, dentro de la cual se pueden distinguir dos grupos: las antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl_{XL}, etc) y las pro-apotóticas, con multidominios pro-apotóticos (Bax, Bad, etc) o sólo con el dominio BH3 (NOXA, PUMA, Bid, etc) (Fig 3, 4). Estas proteínas se localizan normalmente en la membrana externa mitocondrial o en el citosol. En respuesta a una cascada de señalización celular, las proteínas pro-apotóticas se activan, se translocan a la mitocondria y se insertan en la membrana mitocondrial induciendo la liberación del citocromo c y de otras proteínas pro-apoptóticas como Smac/Diablo y AIF. El citocromo c interacciona con Apaf-1 (“Appoptotic Protease Activating Factor 1”), que se unirá a la procaspasa 9, formándose un complejo denominado apoptosoma, que es la forma activa de la caspasa 9. A su vez, ésta activará a la procaspasa 3 (Parone et al. 2002; Gulbins et al. 2003).

Ambas rutas están conectadas a través de Bid, que es proteolizada por la caspasa 8, generando dos fragmentos que se translocan a la mitocondria, induciendo la liberación de citocromo c (Cory y Adams 2002).

- **Ruta del retículo endoplasmático (RE).** Cuando se produce estrés en el retículo endoplasmático (por ejemplo, por acumulación de proteínas mal plegadas) se induce la liberación de Ca²⁺, la activación de la caspasa 12 y la inducción de apoptosis (Nakagawa y Yuan 2000; Nakagawa et al. 2000). Las proteínas de la familia de Bcl-2 se localizan también en la membrana del RE. De hecho, se ha visto que Bim puede regular la activación de la caspasa 12 (Morishima et al. 2004).

Figura 3: Rutas generales de activación de la apoptosis

La apoptosis puede ser activada principalmente por tres rutas: la de los receptores de muerte, la del retículo endoplasmático y la mitocondrial. Estas rutas están conectadas mediante la fragmentación de Bid por la caspasa 8.

La activación de la apoptosis está regulada por varias familias de proteínas que activan o reprimen a la apoptosis, entre ellas destacamos:

- Familia de IAPs: Son proteínas inhibidoras de la apoptosis, se pueden unir a algunas caspasas como la caspasa 9, inhibiéndola. Son inhibidas por la liberación de factores proapoptóticos mitocondriales como Smac/Diablo. Entre ellas la más importante sería XIAP, interacciona con las caspasas 3, 7 y 9, inhibiendo su actividad.

- Familia de proteínas Bcl-2: Está constituida por aproximadamente una docena de miembros, que pueden tener funciones tanto pro como antiapoptóticas. Todos ellos tienen una estructura terciaria similar, formada por 7 u 8 α -hélices, dos de las cuáles son hidrofóbicas y se insertan en la membrana mitocondrial. Se clasifican en tres grupos en función del número de dominios BH3 (revisado por Hengartner 2000).

Figura 4: Clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2

Miembros de la familia Bcl-2		
Antiapoptóticos	Pro-apoptóticos	
Grupo I	Grupo II	Grupo III
Bcl-2	Bax	Bid
Bcl-X _L	Bak	Bik
Bcl-w	Bok	Blk
Mcl-1		Hrk
		Bim
		Bmf
		BNIP3
		PUMA
		Noxa
		Bad

Se dividen en dos grupos según tengan actividad anti- o pro-apoptótica. A su vez, en tres subgrupos (I, II y III) dependiendo de los dominios presentes.

Las p38 MAPKs pueden regular la expresión y/o la función de diferentes proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Porrás et al. 2004), y la regulación de estas proteínas por p38 α puede afectar al balance supervivencia/apoptosis. Estas proteínas pueden ser activadas por diferentes estímulos, y se ha demostrado que tanto Bim como Bcl-x_L, están implicadas en la regulación de la apoptosis en respuesta a ausencia de suero y estrés oxidativo.

También es importante destacar la regulación diferencial de BNIP-3 y su papel dual dependiendo del contexto. Clásicamente se ha asociado a BNIP-3 con una función proapoptótica. Sin embargo, hoy en día se sabe que puede jugar un papel dual en la regulación de la muerte celular funcionando como inductor tanto de apoptosis como de supervivencia (Zhang et al. 2009). Existen varios casos claros donde BNIP-3 está regulado positivamente y da lugar a supervivencia, como ocurre en respuesta a isquemia/reperfusión en el corazón (Zhang et al. 2009) o a hipoxia (Bellot et al. 2009; Zhang et al. 2009).

3.2 p38 MAPK y Apoptosis

Hay un amplio número de evidencias que indican que las p38 MAPKs median diferentes procesos de apoptosis en distintos tipos celulares. Por ejemplo, la apoptosis inducida por la retirada de NGF en las células PC12 (Mearow et al. 2002), por el tratamiento con TNF- α en los adipocitos marrones (Valladares et al. 2000) o por el receptor de células T en linfocitos (Hsu et al. 1999). En este último caso, las p38 MAPKs median la inducción de la expresión del ligando de Fas. También está descrito que p38 MAPK media la traslocación de Bax a la mitocondria en la apoptosis inducida por óxido nítrico (NO) en neuronas y en la inducida por radiación UV en queratinocitos (Van Laethem et al. 2004; Sumbayev y Yasinska 2005). Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno también inducen apoptosis a través de la activación de ASK1 y de p38 MAPK (Sumbayev y Yasinska 2005).

Respecto al papel específico de la isoforma p38 α , datos previos de nuestro grupo han demostrado la implicación de p38 α MAPKs en apoptosis gracias a la utilización de células deficientes en dicha isoforma de p38. Las células deficientes en p38 α son más resistentes a la apoptosis inducida por diferentes estímulos como la retirada de suero, la radiación UV, el ligando de Fas o un ionóforo de calcio, o incluso a la apoptosis en condiciones basales (Porrás et al. 2004; Zuluaga et al. 2007). Así, tanto los cardiomiocitos como los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) deficientes en p38 α son más resistentes a la apoptosis, debido a la menor expresión de proteínas pro-apoptóticas como Fas/CD95 y Bax y a la mayor activación de las rutas de supervivencia de las ERKs y de la Akt (Porrás et al. 2004; Zuluaga et al. 2007). Por otro lado, p38 α es capaz de inducir apoptosis por un mecanismo dependiente de ROS en los primeros estadios de la transformación tumoral, mediada por el oncogén ras (Dolado et al. 2007). Nuestro grupo también ha demostrado la implicación de p38 α , en la inducción de apoptosis, en respuesta al tratamiento con cisplatino en la línea celular HCT116 de cáncer de colon (Bragado et al. 2007).

Otros de los mecanismos a través de los cuales p38 α contribuye a la respuesta apoptótica incluyen: la fosforilación y/o traslocación de las proteínas de la familia de Bel-2, lo que induciría la liberación de citocromo c de la mitocondria (Ghatan et al. 2000; Wang et al. 2004), la activación de la caspasa 8 (Schrantz et al. 2001), la regulación de la fragmentación de Bid y su consecuente activación y traslocación a la

mitocondria (Zhuang et al. 2000), así como la regulación de los procesos de formación de burbujas y condensación nuclear (Deschesnes et al. 2001).

Por el contrario, las p38 MAPKs pueden tener un papel antiapoptótico en algunos tipos celulares, como por ejemplo en cardiomiocitos (Zechner et al. 1998), fibroblastos que han sufrido daño en el DNA o macrófagos activados (Park et al. 2002), entre otros. En algunos de estos casos, podría ser la isoforma β la responsable de este efecto de supervivencia, como parece ocurrir en cardiomiocitos, células Jurkat y células HeLa, donde se ha descrito que p38 α induce apoptosis mientras que p38 β favorece la supervivencia celular (Wang et al. 1998; Mackay y Mochly-Rosen 1999).

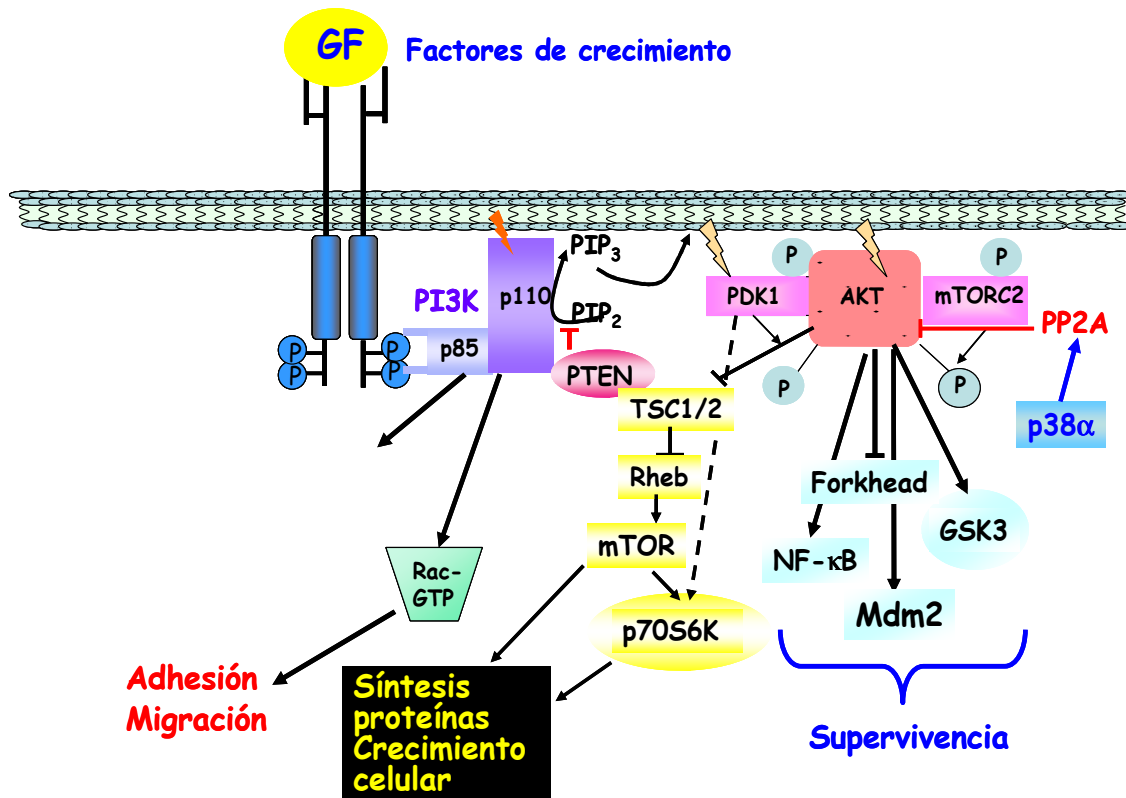
4. RUTAS DE SUPERVIVENCIA: PI3K/AKT/mTOR

La fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) es una enzima con actividad lípido-quinasa, que produce inositoles fosforilados en posición 3, generándose fundamentalmente PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃. Hay múltiples isoformas de PI3K, que pueden ser englobadas en tres clases, pero únicamente las de clase I activarían a la serina/treonina quinasa PKB o Akt (Fresno Vara et al. 2004). La Akt fue identificada gracias al clonaje del oncogén viral v-Akt. Para su completa activación, debe ser fosforilada en dos residuos: la Thr308 por PDK-1 (Alessi et al. 1996) y la Ser473 por mTORC2 (Sarbasov et al. 2005). Por otro lado, la inactivación de la ruta PI3K/Akt está mediada por PTEN, fosfatasa que desfosforila los PIP3.

La ruta de la PI3K/Akt puede modular diferentes funciones celulares a través de la regulación de múltiples sustratos, bien, directamente por la PI3K y/o por la Akt. La Akt fosforila numerosos sustratos, regulando así múltiples procesos celulares como son la supervivencia celular, el crecimiento y el ciclo celular, la adhesión celular o el metabolismo glucídico (Cantley 2002). Entre todas estas funciones, es importante su papel en la regulación de la supervivencia gracias a la fosforilación de GSK3, Mdm2, Bad, caspasa 9, factores de transcripción de la familia de Foxo e IK quinasas (IKKs) (Vanhaesebroeck y Alessi 2000) que conducen a la activación de rutas de supervivencia y/o inactivación de proteínas pro-apoptóticas (Fig. 5). Por otro lado, la activación de mTOR/p70S6K, a través de la fosforilación e inactivación de TSC2 induce la traducción de proteínas, muchas de las cuales están implicadas en el crecimiento celular y/o en la supervivencia (revisado por Bhaskar y Hay 2007). De hecho, Akt está hiperactivada en

muchos tumores, jugando un papel fundamental en el mantenimiento de la supervivencia celular y en la generación de resistencia frente a la terapia antitumoral (Vivanco y Sawyers 2002; Yuan y Cantley 2008).

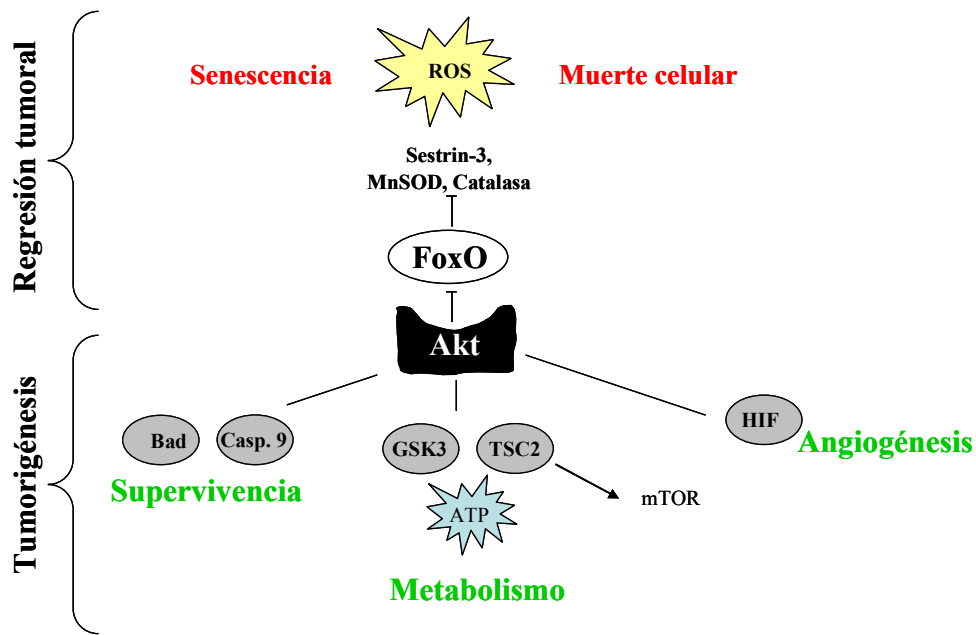
Figura 5: Vía de supervivencia de la PI3K/Akt



La PI3K es activada por múltiples señales como las que actúan a través de receptores tirosina quinasa. A su vez, la PI3K activa diferentes rutas, entre las que destaca la de Akt, que fosforila a distintos sustratos, induciendo supervivencia y activación de la traducción vía mTOR/p70S6K.

En contraste con esto, datos recientes de la bibliografía indican que la activación de la Akt también puede favorecer el incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumentando así la susceptibilidad a la muerte celular inducida por estrés oxidativo (Nogueira et al. 2008). Este efecto se debe a la inhibición sostenida del factor de transcripción FoxO3a, el cual, normalmente regula positivamente la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD o SOD-2) y la catalasa (Nogueira et al. 2008). Por ello, las células con mayor actividad de Akt serían más vulnerables al estrés oxidativo.

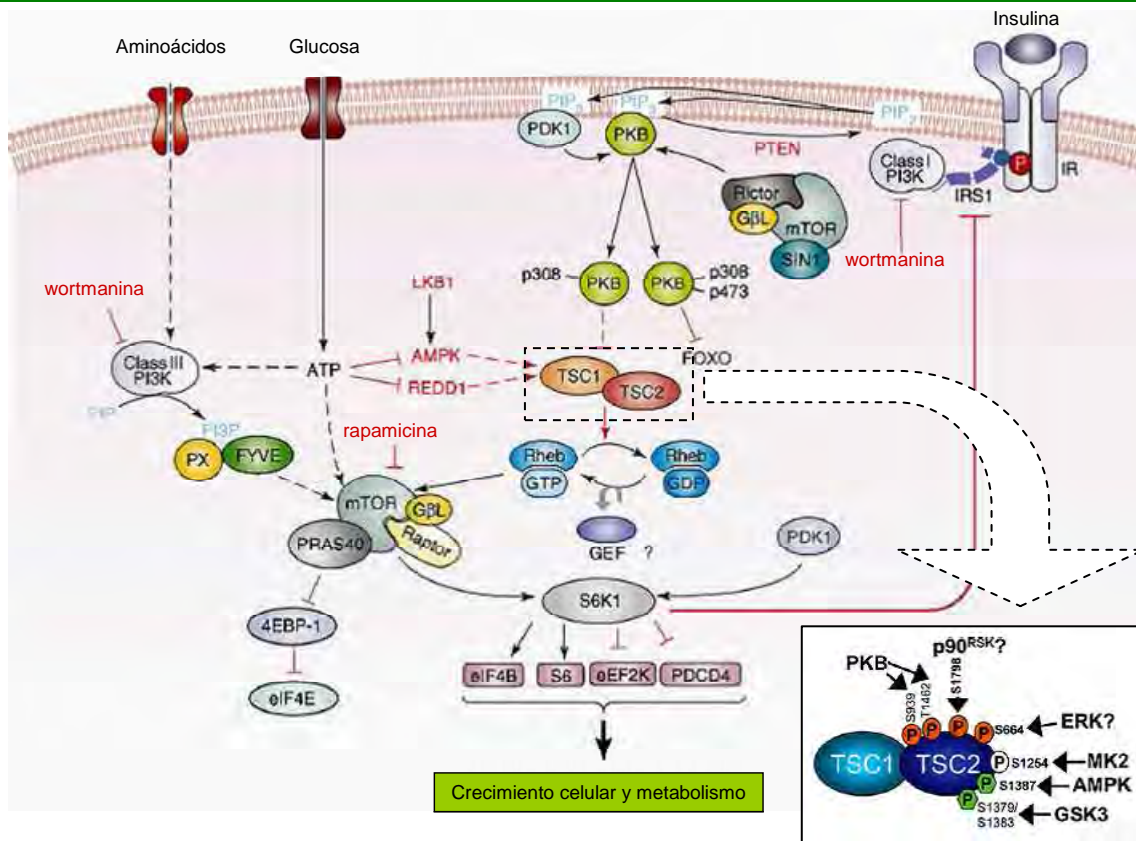
Figura 6: Representación simplificada del doble papel de Akt en el desarrollo tumoral



Activaciones moderadas de Akt inhiben apoptosis e induce crecimiento celular y angiogénesis a través de varios mecanismos. Por el contrario, hiperactivaciones de la Akt dan lugar a senescencia y muerte celular por apoptosis (Modificado de Los et al. 2009).

Por otro lado, como ya hemos señalado, la Akt juega un papel importante a través de la regulación de mTOR/p70S6K. Akt activa al complejo mTORC1 (mTOR-Raptor-PRAS40) a través de la fosforilación de TSC2, lo que da lugar a la inactivación del complejo TSC1/TSC2 (Fig. 7). De esta forma, TSC2 pierde su actividad GAP sobre Rheb, lo que permite a Rheb permanecer en su estado activo (Rheb-GTP) activando así a mTOR. Una vez activado, mTORC1 fosforila a p70S6K en Ser389, permitiendo su activación, lo cual, es una señal positiva para la puesta en marcha de la traducción. A su vez, mTORC1 fosforila a 4EBP-1, inactivándolo, lo que también conduce a la activación de la síntesis de proteínas (revisado por Bhaskar y Hay 2007).

Existen otros reguladores de mTORC1/p70S6K, tanto positivos como negativos. Algunos actúan directamente a través de la fosforilación de p70S6K en otros residuos o regulando a TSC2. En este sentido, cabe destacar la fosforilación de TSC2 por AMPK en el residuo Ser1387 que da lugar a una activación del complejo TSC1/2 e inactivación de mTORC1/p70S6K (Fig. 7). Akt es capaz de inactivar a AMPK, contribuyendo así a la inactivación de TSC1/2 que también se produce por otros mecanismos (revisado por Proud 2007). También LKB-1 es capaz de regular a mTOR vía AMPK/TSCs (revisado en Yang y Guan 2007).

Figura 7: Regulación de la ruta de mTORC1 y mTORC2

mTORC1 fosforila a p70S6K y a 4EBP-1. La actividad quinasa de mTORC1 (mTOR-Raptor-PRAS40) es estimulada por Rheb-GTP. La hidrólisis de GTP a GDP de Rheb es estimulada por el complejo TSC-2/TSC-1 regulando negativamente a mTORC1. TSC-2 puede ser fosforilado en múltiples sitios (en verde, sitios de activación) por las quinasas indicadas en la figura (basada en TSC-2 humano). mTORC2 (mTOR-Rictor-SIN1) fosforila a Akt (PKB) en Ser473 (adaptado de Proud 2007 y Dann et al. 2007).

Dentro de estos reguladores, también debemos mencionar a REDD1. Es una proteína inducida en condiciones de hipoxia o depleción crónica de energía. Su inducción conduce a la inhibición de la activación de p70S6K por mTORC1. La ausencia de REDD1 no altera la activación de AMPK ni la fosforilación de TSC2. Aunque el mecanismo inhibitorio de REDD1 sobre p70S6K no se conoce en profundidad, sí se sabe que se realiza a través de TSC2 (revisado por Dann et al. 2007).

Además del complejo mTORC1 que, como hemos indicado, está formado por mTOR, Raptor y otras proteínas como mLST8 o PRAS40, mTOR puede formar el complejo mTORC2 cuando se asocia a Rictor y otras proteínas como Protor-1, mLST8 y SIN-1 (Fig.7). Este último complejo (mTORC2) parece ser responsable de la fosforilación de Akt en el residuo Ser 473 (Manning 2004), esencial para que Akt

alcance su máxima actividad. A diferencia de mTORC1, mTORC2 no se inhibe por rapamicina.

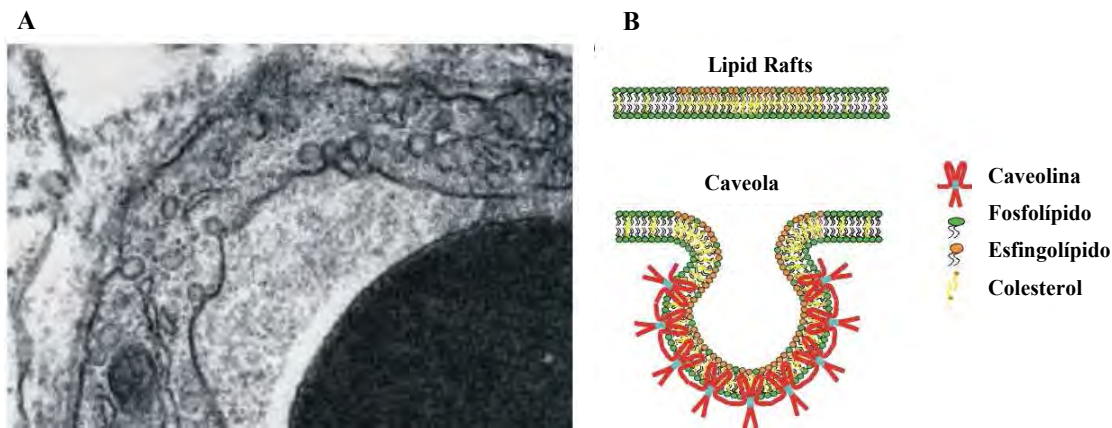
La ruta de Akt/mTOR/p70S6K se ha asociado fundamentalmente con la regulación del crecimiento y la supervivencia celular a través de un mecanismo dependiente de la activación de la síntesis de proteínas. No obstante, hay muchos datos recientes que indican que mTOR también juega un importante papel en la regulación de la autofagia (Jin et al. 2007), que es una ruta degradativa lisosomal que permite el reciclaje de los constituyentes celulares (revisado por Boya et al. 2008), lo que parece conducir, en unos casos, a la muerte celular y en otros, a la supervivencia (Jin et al. 2007).

5. CAVEOLAS Y CAVEOLINAS

5.1 Generalidades

La membrana plasmática está organizada en diferentes subdominios de conjuntos de macromoléculas. Estos subdominios incluyen estructuras adhesivas y otros microdominios denominados balsas lipídicas (“lipid rafts”), que son regiones donde se forman agregados de proteínas y tienen una composición lipídica característica. Parece que se originan por asociación de glucoesfingolípidos, esfingomiélin y colesterol en el aparato de Golgi. Están enriquecidos en varios tipos de proteínas, como son las proteínas unidas a GPI (“glucosil-fosfatidil-inositol”). Los esfingolípidos presentes en los “lipid rafts” contienen principalmente cadenas de ácidos grasos saturados, que permiten un gran empaquetamiento. Por ello, su temperatura de fusión (T_m) se encuentra alrededor de 41°C (Schroeder et al. 1994). A su vez, su composición los hace resistentes a la extracción por detergentes suaves no iónicos, como el Tritón X-100, a 4°C (Simons y Ikonen 1997).

Las caveolas son un tipo de “lipid rafts”, morfológicamente identificables y distinguibles de las vesículas recubiertas de clatrina. Su característica principal es la presencia de la proteína de revestimiento caveolina-1, que es indispensable para la invaginación de la membrana plasmática. También hay otras proteínas en las caveolas como las flotilinas, LAT, MAL/BENE, estomatinas y VIP36 (Razani et al. 2002).

Figura 8: Estructura de las caveolas

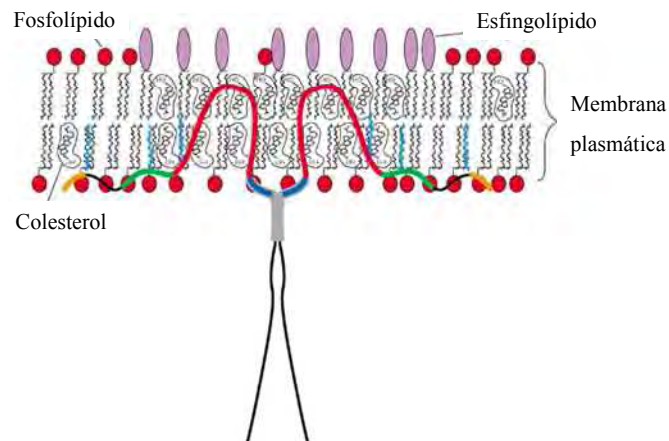
A) Fotografía de microscopía electrónica de una célula endotelial mostrando las caveolas. **B)** Las caveolas son microdominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol. En su parte interna están recubiertas por complejos oligoméricos de caveolina, que interacciona con la bicapa lipídica a través de su dominio hidrofóbico. Morfológicamente adquiere una conformación de botella (Adaptado de Razani y Lisanti 2001).

El tamaño de las caveolas oscila entre 50 y 100 nm y presentan forma de botella. Pueden encontrarse aisladas o agrupadas, formando distintas estructuras. Se identificaron inicialmente en endotelios de capilares y células epiteliales de vesícula biliar de ratón (Palade 1953; Yamada 1955), pero actualmente se sabe que están en diversos tipos celulares, destacando por ejemplo en adipocitos, en los que el 20% de la membrana plasmática corresponde a caveolas (Fan et al. 1983). La presencia de caveolas incrementa considerablemente la superficie celular, lo que concuerda con la idea de que las caveolas están implicadas en el transporte de macromoléculas.

La caveolina-1 se identificó inicialmente como una proteína de 21-22 kDa que se inmunoprecipitaba utilizando un anticuerpo frente a tirosinas fosforiladas. Se comprobó que se localizaba en las zonas marginales de la célula, concentrada en forma paralela a lo largo de las fibras de estrés de actina. También se comprobó que era resistente al aislamiento por medio de detergentes no iónicos (revisado por Hnasko y Lisanti 2003). Finalmente, se ubicó en las caveolas por microscopía electrónica. Paralelamente, fue identificada la proteína VIP21, que era insoluble en el detergente CHAPS. Se localizaba en el aparato de Golgi, membrana plasmática y en las vesículas unidas a membrana (Cohen et al. 2004). Estudios posteriores pusieron de relieve que su secuencia coincidía con la de la caveolina-1.

La caveolina-1 es una proteína integral de membrana, cuyos extremos amino y carboxi terminal se orientan hacia el citosol. Además, tiene un dominio central hidrofóbico, que se inserta en la bicapa lipídica.

Figura 9: Estructura de la caveolina-1 insertada en la membrana



La caveolina-1 insertada como dímero en las caveolas de la membrana presenta una conformación de horquilla (Monier et al., 1995).

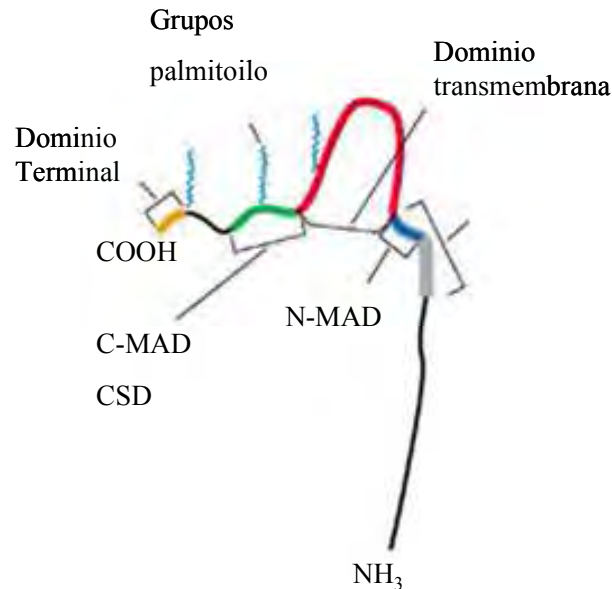
Aunque inicialmente se identificó a la caveolina-1, como la única proteína esencial para la formación de caveolas, ahora se sabe que hay tres proteínas que conforman la familia de las caveolinas codificadas por tres genes: caveolina-1, 2 y 3 (Fig. 10). Además, existen diferentes isoformas de las caveolinas 1 (α y β) y 2 (α , β y γ).

Proteína	Isoformas	Características	Localización	Expresión
Caveolina-1	α y β	Forma caveolas por sí misma Forma oligómeros	Membrana Uniones célula-célula Surco citoquinesis Trans-Golgi Endosomas	Ubicua
Caveolina-2	α , β y γ	No forma caveolas por sí misma No forma oligómeros	Membrana	Ubicua
Caveolina-3		Forma caveolas por sí misma Forma oligómeros	Membrana Sistema tubular T Sarcolema	Músculo esquelético Diafragma Corazón

Figura 10: Características de las isoformas de caveolina (Revisado en Cohen et al. 2004 y Parat 2009).

La caveolina-1 tiene una función dual: anclar proteínas en las caveolas y regular positiva o negativamente su actividad.

Figura 11: Dominios presentes en la molécula de caveolina-1



Existen dos regiones adyacentes al dominio hidrofóbico central (residuos del 82-101 y 135-150), que se unen a la membrana con alta afinidad: dominio N-terminal de unión a membrana, N-MAD (“N terminal Membrane Attachment Domain”) y dominio C-terminal de unión a membrana, C-MAD (“C-terminal Membrane Attachement Domain”). Toda la región N-MAD es necesaria para su localización en caveola, siendo la secuencia KYWFYR responsable de la unión a membrana. La caveolina-1 tiene también un dominio de anclaje (aminoácidos 82-101), CSD (“scaffolding domain”) que media interacciones proteína-proteína (Williams y Lisanti 2004).

En cuanto a la regulación de la expresión y distribución de la caveolina-1, distintos experimentos parecen indicar que la cascada de las ERK MAPKs posee un papel fundamental en el control de su expresión a nivel transcripcional (Engelman et al. 1999), de forma paralela a la activación de la proliferación celular. A su vez, VEGF, bFGF o HGF regulan su expresión en células endoteliales (Lin et al. 1999). Por otro lado, las quinasas Src y PKA reducen la transcripción de caveolina 1 (Razani et al. 2002). Además, hay otros mecanismos no transcripcionales que regulan los niveles de caveolinas. Así, se ha visto que en ratones deficientes en caveolina-1 se pierde la caveolina-2 por degradación en el proteosoma.

5.2 Funciones de las caveolas y caveolinas

Las caveolas tienen diferentes funciones a nivel celular, entre las que destacan: transporte vesicular de macromoléculas por transcitosis o endocitosis, regulación de la homeostasis del colesterol y transducción de señales (revisado por Parat 2009).

Respecto a la regulación de la homeostasis del colesterol, cabe señalar que la caveolina-1 modula su flujo de entrada y salida, transportando el colesterol de nueva síntesis desde el retículo endoplásmico a la caveola, desde donde se transfiere a las lipoproteínas plasmáticas HDL (Graf et al. 1999). El colesterol, por otro lado, regula la expresión de caveolina-1 de forma positiva a través de dos elementos de unión a esteroides en su promotor y estabiliza la proteína (Frank et al. 2002). Por ello, los agentes que se unen al colesterol o que lo deplecionan como la β -metilciclodextrina rompen la estructura de las caveolas.

No obstante, entre las funciones que llevan a cabo las caveolas, destaca su papel en la transducción de señales. Las caveolas facilitan el reclutamiento de proteínas y lípidos modulando así, la dinámica y funcionalidad de las moléculas de la membrana plasmática (Lajoie et al. 2009). Las caveolas actuarían como plataformas donde se procesan diversas señales extracelulares, existiendo numerosos datos tanto de activación como de inhibición de señales extracelulares (revisado por Salanueva et al 2007). Estas modificaciones en la señalización mediada por la caveolina-1 pueden ser directas o indirectas. Se han descrito inhibiciones directas en muchas proteínas como por ejemplo Src, receptor de EGF, eNOS, proteínas G heterotriméricas y H-Ras (revisado por Okamoto et al. 1998). También existen datos de activaciones directas como el descrito para el receptor de insulina (Yamamoto et al. 1998). Con respecto a las modulaciones indirectas, estaría relacionado con la presencia o ausencia de determinados efectores en numerosas rutas de señalización. Las regiones de membrana enriquecidas en colesterol unen selectivamente determinadas proteínas y provocan la exclusión de otras (Simons e Ikonen 1997; Jacobson et al. 2007). Por ejemplo, se conocen varias tirosina-quinazas que se concentran en los “lípid-rafts” amplificando así las cascadas de señalización reguladas por tirosina quinazas (Harder y Simons 1999). Aunque también se conoce el efecto contrario, según el cual p38 α induciría la unión de la fosfatasa PP2A en las caveolas modulando negativamente la activación de Akt (Zuluaga et al. 2007).

Destacan los datos que relacionan a la caveolina-1 con la regulación de las señales iniciadas por integrinas. Recientes trabajos en esta área, se han centrado en la activación mediada por integrinas de la ruta de señalización regulada por la GTPasa Rac-1 en respuesta a la adhesión celular a la matriz extracelular. La activación de Rac-1 mediada por integrinas sería similar a la mediada por factores de crecimiento, pero con la salvedad de que la mediada por integrinas se produce en las caveolas, donde Rac-1 puede interaccionar con su efector PAK. Por ello, en ausencia de activación de integrinas, Rac-1 no puede interaccionar con PAK, aun cuando se detecten altos niveles de Rac-GTP (activado por factores de crecimiento) en esas células (del Pozo et al. 2000). Por otro lado, también se ha relacionado la señalización mediada por integrinas con la internalización de las caveolas, que está mediada por adhesión celular y es dependiente de cambios en la fosforilación de la caveolina-1 (del Pozo et al. 2005). Por ello, la pérdida de adhesión causa la internalización de las caveolas, por un proceso dependiente de dinamina II y de caveolina-1 fosforilada en la tirosina 14 (revisado por Salanueva et al. 2007). Estos estudios apoyan la idea de que las integrinas regulan procesos celulares controlando la localización de caveolas en la membrana plasmática. La internalización de las caveolas es una forma efectiva de desacoplar muchas rutas de señalización de sus efectores en condiciones de ausencia de adhesión.

Además, las caveolinas están implicadas en muchas enfermedades. La pérdida de caveolina-1 produce cardiopatía e hipertrofia cardíaca (Cohen et al. 2003) y se ha asociado a ciertos procesos tumorales (revisado por Ho et al. 2002; Kato et al. 2002; Li et al. 2001; Suzuoki et al. 2002). La pérdida de la expresión de caveolina-3, produce una cardiopatía caracterizada por hipertrofia y dilatación (Woodman et al. 2002), mientras que la sobreexpresión provoca una cardiopatía caracterizada por la desorganización y degeneración del miocito (Aravamudan et al. 2003). La delección de los dos genes de caveolina-1 y 3 también produce cardiopatía y un dramático incremento en el espesor de la pared del ventrículo izquierdo, en comparación con los ratones deficientes en cada uno de estos genes por separado y los de fenotipo salvaje (Park et al. 2002).

6. FAMILIA DE PROTEÍNAS G DE BAJO PESO MOLECULAR DE LA SUBFAMILIA DE Rho/Rac:

6.1 Generalidades

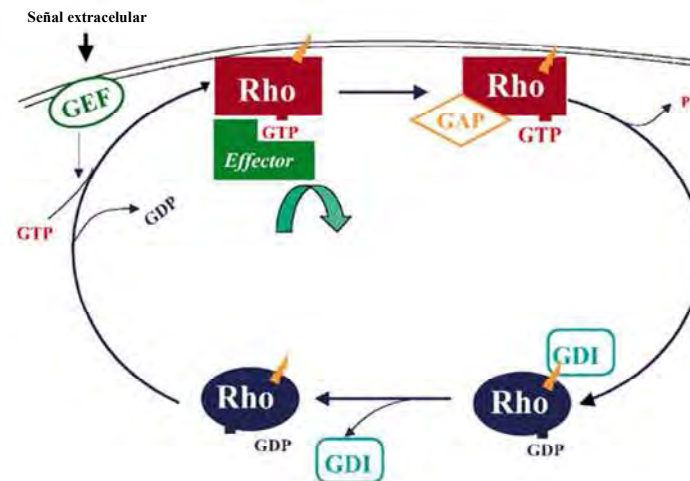
Las proteínas de la subfamilia Rho/Rac pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras, que son proteínas G de bajo peso molecular, caracterizadas por tener actividad GTPasa intrínseca.

Generalmente, son de pequeño tamaño (190-250 aminoácidos), aunque algunas más atípicas pueden tener hasta 700 residuos. Contienen un dominio GTPasa y regiones C-terminal y N-terminal cortas. En su dominio GTPasa presentan un 30% de identidad con las proteínas de la subfamilia Ras y entre un 40 y un 95% dentro de su propia subfamilia. La mayoría están modificadas en la región carboxi-terminal por adición de isoprenoides, lo que facilita su localización en membranas específicas.

Actualmente se conocen 20 genes que codifican para más de una docena de proteínas de la familia de Rho en humanos (Wherlock y Mellor 2002). Las más estudiadas son RhoA, Rac-1 y Cdc42, las cuales, juegan un papel importante en la organización del citoesqueleto, lo que conduce a la regulación de múltiples funciones celulares como son la adhesión celular, migración, proliferación, supervivencia y diferenciación, así como la transformación celular (Manser 2002).

Funcionan como un interruptor molecular alternando entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo, unido a GTP. Cuando cesa la señal activadora, gracias a su actividad GTPasa, el GTP se hidroliza, dando lugar a GDP, con lo que la proteína se inactiva (Wennerberg y Der 2004). El intercambio de GDP por GTP está regulado catalíticamente por dos tipos de moléculas, los factores activadores del intercambio de nucleótidos (GEFs) y las proteínas que estimulan la hidrólisis del GTP (GAPs), que aumentan la actividad GTPasa intrínseca de estas proteínas, facilitando su inactivación (Fig. 12). Las GTPasas de esta familia también están controladas por las proteínas Rho GDI, las cuales mantienen inactivas a las GTPasas en el citosol. Además, se han descrito procesos de regulación de los niveles de estas proteínas por cambios de expresión a nivel transcripcional, cortes por caspasas o degradación por ubiquitinación (revisado por Bustelo 2002; Bustelo 2002).

Figura 12: Ciclo de actividad de las GTPasas Rho/Rac



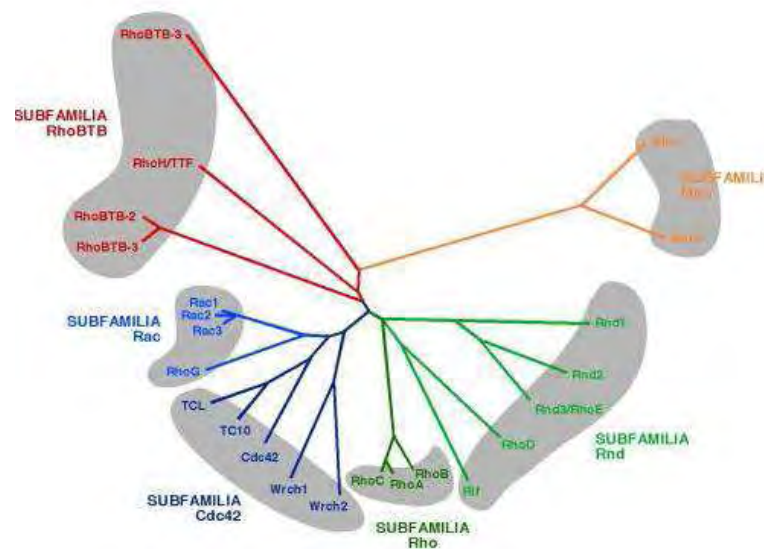
Las GTPasas de la familia Rho son moléculas que ciclan entre un estado inactivo, unido a GDP y un estado activo, unido a GTP. Los GEFs estimulan la activación de las Rho GTPasas liberando el GDP y permitiendo la entrada de GTP. Las proteínas GAP se encargan de estimular la capacidad intrínseca de la GTPasa de hidrolizar GTP a GDP completando el ciclo. Los GDI mantienen a la GTPasa en el citosol en forma inactiva (modificado de Fiorentini et al. 2003).

Los miembros de la subfamilia Rho/Rac se pueden clasificar dentro de seis grupos, con distintas propiedades:

- 1- RhoA (RhoA, RhoB y RhoC)
- 2- Rac (Rac1, Rac1c, Rac2, Rac3 y Rho G)
- 3- Cdc42 (Cdc42, Tc10, TCL, Chp/Wrch-2 y Wrch-1)
- 4- Rnd (Rnd1, Rnd2 y RhoE/Rnd3)
- 5- RhoBTB
- 6- Miro

RhoD, Rif y TTF/RhoH, por sus características específicas, no encajan en ninguno de estos grupos.

Figura 13: Subfamilias de las GTPasas Rho/Rac



Dendograma de acuerdo con la homología estructural. Los miembros de cada familia se agrupan en áreas sombreadas (adaptado de Bustelo et al. 2007).

6.2. Proteínas Rac

6.2.1. Generalidades

Todas las proteínas de este grupo son capaces de estimular la formación de lamelipodios y estructuras de tipo ondulación ("*ruffles*") en la membrana plasmática, presumiblemente a través de su interacción con el complejo PIR121-Nap125-HSPC300-WAVE (Eden et al. 2002). Rac-1, 2 y 3 divergen en los 15 primeros aminoácidos de sus extremos C-terminal, mientras que RhoG presenta un 72% de identidad en su secuencia con respecto a Rac-1. Hay una variante de Rac-1 obtenida por corte y empalme alternativo, Rac-1b, que tiene 19 residuos insertados directamente en el extremo C-terminal (Fig. 14). Se expresa preferentemente en cánceres de mama y de colon (Jordan et al. 1999; Schnelzer et al. 2000).

	Homología				Expresión	Localización (en forma GTP)	Letal (embrio naria)
	Rac-1	Rac-2	Rac-3	Rho			
Rac-1	-	88%	77%	72%	Ubicua	Endomembranas Membrana celular	+
Rac-2	88%	-	83%		Células hematopoyéticas	Endomembranas	-
Rac-3	77%	83%	-	69%	Cerebro Líneas de sarcoma y leucemia Detectado RNAm en hígado, páncreas y riñón	Endomembranas Membrana celular	+

Figura 14: Características de las principales isoformas de Rac (Fuente: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 2009)

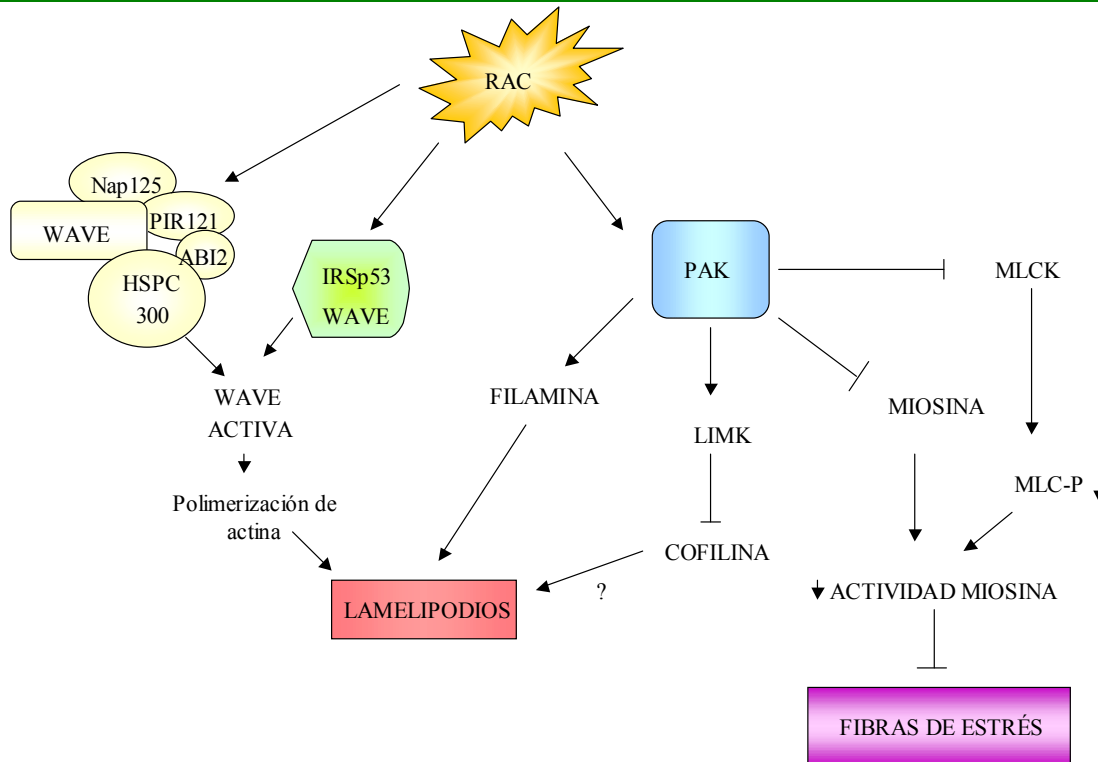
6.2.2. Función

Las funciones principales de Rac están relacionadas con su papel en la regulación del citoesqueleto regulando diferentes funciones celulares tales como adhesión, migración, proliferación, diferenciación y muerte celular (revisado por Bustelo et al. 2007).

Rac promueve el ensamblaje de los filamentos de actina en la periferia celular para generar lamelipodios y ondulaciones de membrana (Ridley et al. 1992). La regulación del citoesqueleto de actina es fundamental para llevar a cabo otras funciones celulares como es el establecimiento de la morfología y polaridad celular o procesos de migración (revisado por Bustelo et al. 2007). Para ello, Rac estimula a Arp2/3, que posee un papel preponderante en la polimerización de la actina a través de la proteína WAVE/Scar, que pertenece a la familia WARP (Fig. 15) (Miki et al. 1998; Machesky y Insall 1998). WAVE no se une directamente a Rac, sino a través de proteínas de unión a Rac, como son Nap125 y PIR121 (Eden et al. 2002). La quinasa PAK (“*p21-Activated Kinase*”) es otro efector de Rac, cuya función es compleja y muchas veces, específica de tipo celular (Bokoch 2003). También se activa por Cdc42 y puede promover la formación de lamelipodios (Sells et al. 1997) y la pérdida de fibras de estrés y adhesión focal (Manser et al. 1997), aunque lo primero también puede ocurrir en ausencia de PAK. Algunos de sus efectores son la quinasa LIMK (que inhibe a la cofilina), la miosina, la filamina, el complejo paxilina/Pix/PKL y Nck. La filamina es esencial para

la formación de "ruffles" de membrana en respuesta a factores de crecimiento (Vadlamudi et al. 2002).

Figura 15: Vías de regulación del citoesqueleto mediadas por Rac



Arp 2/3 es una proteína implicada en la nucleación del proceso de polimerización de actina. Su activación por parte de Rac está mediada por WAVE (proteína de la familia WASP). Rac no se une directamente a WAVE, sino que la activa bien a través de su interacción con la proteína IRSp53 (Krugmann et al, 2001), o bien desencadenando la disociación de WAVE del complejo que forma con las proteínas de unión a Rac, Nap125 y PIR121 (Eden et al., 2002). Por otro lado, el efector de Rac, PAK es capaz de activar a LIMK (LIM Kinase) y bloquear a MLCK (quinasa de la cadena ligera de la miosina), estimulando la formación de fibras de estrés y lamelipodios.

También se ha descrito una función reguladora de la transcripción a través de la activación de la cascada de señalización de JNK/c-Jun (Coso et al. 1995) que puede dar lugar a la regulación de diferentes funciones celulares, incluida la proliferación. De hecho, estas GTPasas están ampliamente relacionadas con el control de la proliferación celular, participando en diversas etapas y procesos del ciclo celular (Coleman et al. 2004). También median procesos de endocitosis y fagocitosis (Ridley 2001).

En algunos tipos celulares como los fibroblastos, Rac y Rho inducen la agrupación de integrinas, permitiendo así un aumento de la fuerza de adhesión. Los complejos de integrinas inducidos por Rac se denominan complejos focales y son

menores que las adhesiones focales. Rac puede reclutar integrinas de alta afinidad a regiones donde una nueva protrusión de la membrana está teniendo lugar (Kiosses et al. 2001).

6.2.3. Regulación

En cuanto a la regulación de Rac, hay que señalar que puede ser activada por multitud de señales, como la bombesina, PMA y numerosos factores de crecimiento como el EGF. Además, existen diversos mecanismos de activación de Rac, tanto dependientes como independientes de sus GEFs. Muchos de los GEFs activadores de Rac son activados por inosítoles fosfato como el PIP_2 y PIP_3 (Schmidt y Hall 2002; Mertens et al. 2003). Otros se localizan en la membrana por interacción directa con la subunidad p85 de la PI3K (Innocenti et al. 2003). Además, los GEFs se pueden activar por mecanismos independientes de PI3K, como es el caso de Tiam1 (Lambert et al. 2002), que se puede activar por la cascada PLC/CaMKII (Mertens et al. 2003), haciendo que se localice en la membrana. Por otro lado, Ras es capaz de activar a Rac a través de la activación de PI3K, que genera PIP_3 y activa a Vav, un GEF específico de Rac (Han et al. 1998). Además, existen otros activadores como el complejo Sos-Eps8-E3bl, que tiene actividad RacGEF y facilitan una determinada localización subcelular de Rac a través de su interacción con la F-actina (Scita et al. 1999; Innocenti et al. 2002).

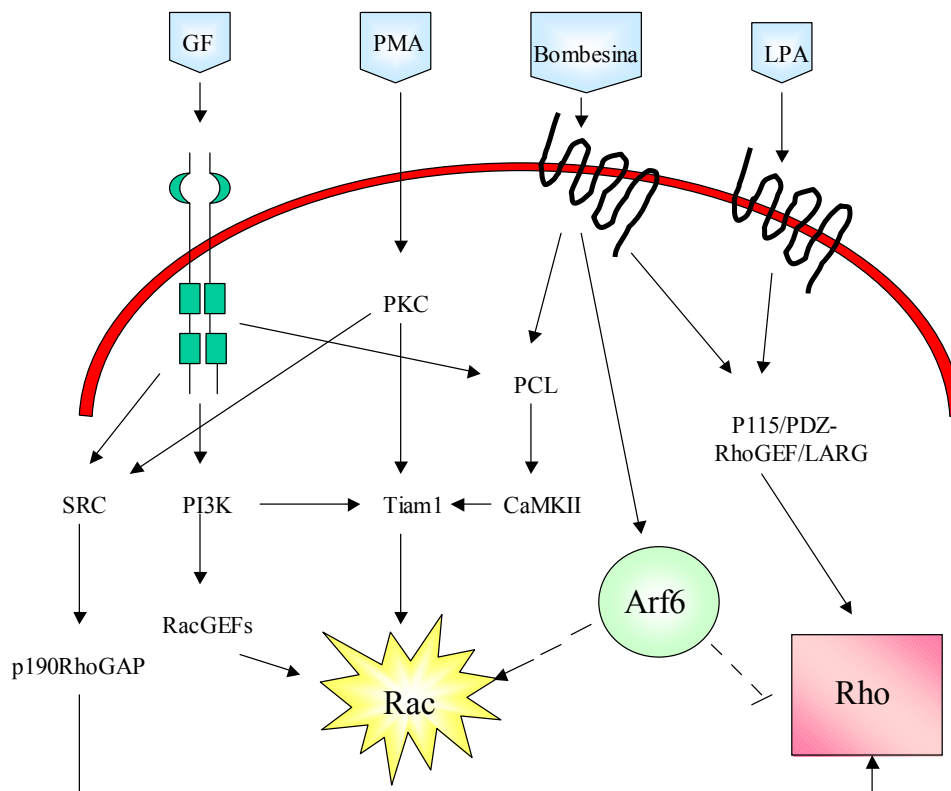
Por otro lado, existen proteínas que facilitan la inactivación de Rac como son las quimerinas, una familia de proteínas activadas por diacilglicerol, que estimulan la actividad intrínseca GTPasa de Rac (Caloca et al. 2003).

Es importante destacar que la actividad de Rac también se regula por moléculas de adhesión, a través de la activación de receptores de tipo integrina (DeMali et al. 2003) o de otro tipo, y por proteínas que intervienen en las interacciones célula-célula como las cadherinas (Braga 2002). Además, la adhesión celular mediada por integrinas no sólo inicia señales, sino que también modula la transducción de señales activadas por receptores de factores de crecimiento (Schwartz y Ginsberg 2002).

Las integrinas regulan la activación y la localización de Rac-1 y Cdc42 en la membrana plasmática (del Pozo et al. 2004). De hecho, la activación de integrinas estimula la unión de la forma activa de Rac-1 (Rac-GTP) a caveolas y “lipid rafts”, desplazando a Rac-1 de su interacción con GDI en el citosol. De esta forma, se facilita

la interacción de Rac-1-GTP con su efector PAK, que se localiza preferentemente en las caveolas. Se ha demostrado que Rho y Cdc42, se suelen localizar en estas regiones, donde interaccionarían con sus efectores (revisado por Salanueva et al. 2007). Por ello, la ruptura de estos dominios de membrana mediante la depleción de colesterol de la membrana, impide la unión de Rac-1 a la membrana, la activación de PAK y mimetiza la pérdida de adhesión de las células (del Pozo et al. 2004).

Figura 16: Vías principales de regulación de las proteínas Rac y Rho



Rac puede ser activado por factores de crecimiento, como PDGF y EGF, así como por agonistas de PKC, como el PMA. La actividad PI3K regula positivamente a los GEFs de Rac, desencadenando la estimulación de Rac. Además, estos factores pueden activar a PLC y CaMKII, la cual, fosforila a Tiam1, induciendo su localización en la membrana y su activación.

6.2.4. Papel de Rac en la regulación de las p38 MAPKs

En diferentes sistemas celulares y en respuesta a distintas señales se ha descrito la interacción que se produce entre la ruta de Rac y de las p38 MAPKs, de manera que Rac es capaz de activar a p38 a través de diferentes vías.

Se ha comprobado que la angiotensina II produce hipertrofia a través de la activación de JNK y p38 MAPK (Nishida et al. 2005), y que Ki-Ras desencadena la activación de Rac, que a su vez estimula la vía de señalización de p38 MAPK (Choi et al. 2004). A su vez, en células epiteliales de mama, Rac-1 es capaz de activar a la cascada MKK3/6/p38MAPK, la cual, es un mediador esencial para la migración e invasión inducidas por H-Ras (Shin et al. 2005). Por otro lado, el GEF de Rac-1, Tiam1, a través de su interacción con IB2/JIP2, favorece la activación de p38 por Rac-1 (Buchsbaum et al. 2002). También se ha descrito que Rac funciona como subunidad de la NADPH oxidasa, activando la producción de ROS que activan a la ruta de las p38 MAPKs (Gregg et al. 2003).

Por otro lado, en respuesta a estrés, p38 MAPK también puede ser activada por Rac. Así, por ejemplo, la ionomicina induce muerte celular por necrosis a través de la activación de la cascada Rac-1/p38 MAPK (Eom et al. 2001a). Además, Rac-1 puede activar a p38 MAPK en respuesta a la radiación UV (Eom et al. 2001b). Otra señal que parece conectar a Rac-1 con p38 MAPK la constituiría el LPS (Woo y Kim 2002), o la hiperosmolaridad (Uhlik et al. 2003).

7. C3G

7.1 Generalidades

C3G es una proteína activadora del intercambio de nucleótidos de guanina o GEF (“*Guanine- nucleotide- Exchange Factor*”) de dos miembros de la familia de proteínas Ras: Rap1 (Gotoh et al. 1995) y R-Ras (Gotoh et al. 1997).

La proteína C3G fue identificada por el grupo de Matsuda en 1994 (Tanaka et al. 1994). Se observó que la diferenciación neuronal de las células PC12 inducida por Crk se bloqueaba al sobreexpresar péptidos que se unían al dominio SH3 de Crk. Esto sugería la posibilidad de que el dominio SH3 mediara interacciones con otras proteínas que interferirían con Crk. Por ello, utilizando como cebo el dominio SH3 amino de Crk (con la secuencia común de las dos isoformas c-Crk I y c-Crk II y de la forma oncogénica v-Crk) se analizó una genoteca de cDNA extraída de placenta humana. Se detectó una secuencia de 4070 pb, generada a partir de la combinación de cinco

pequeñas secuencias solapantes que presentaba un marco de lectura abierto (ORF) de 3231 pb y que codificaba una proteína de 1077 KDa, que se denominó C3G por “*Crk SH3 domain-binding Guanine nucleotide exchange factor*”.

En ese mismo año se clonó la misma proteína, a partir de una genoteca de células Hela utilizando el mismo cebo. Esta secuencia difería en el aminoácido 287. Posteriormente, se han obtenido nuevas secuencias que codifican para C3G con ligeras modificaciones. El grupo del Dr. E. Santos, a partir de una genoteca de cDNA extraída de placenta humana, clonó otra versión del gen con una secuencia que difería en el extremo 5' en comparación con la secuencia de Tanaka (comenzando la proteína por M-S-G-K-I-E-K-A en vez de por M-D-T) y en las posiciones 281, 287 y 355 (se identificó S, T y D en vez de G, P y G) (Guerrero et al. 1998).










Gen		Identidad (%)		Nº pubmed	Nº aa	Estructura
Especies	Símbolo	Proteína	DNA			REM/CdC-25H
Homo sapiens	RAPGEF1			NP-941372.1	1095	
vs. Pan troglodytes	RAPGEF1	99.5	99.5	XP_001167804.1	1095	
vs. Canis lupus familiaris	RAPGEF1	93.8	90.0	XP_548407.2	1288	
vs. Bos taurus	RAPGEF1	93.0	89.0	XP_598698.3	1094	
vs. Mus musculus	Rapgef1	92.9	87.5	NP_473391.1	1086	
vs. Gallus gallus	RAPGEF1	85.8	79.2	XP_415456.2	1091	
vs. Danio rerio	CH211-127H20.2	68.5	64.7	XP_686957.3	1076	
vs. Drosophila melanogaster	C3G	42.0	50.2	NP_572350.2	1571	
vs. Anopheles gambiae	AgaP_AGAP000932	45.6	52.8	XP_309117.4	1285	

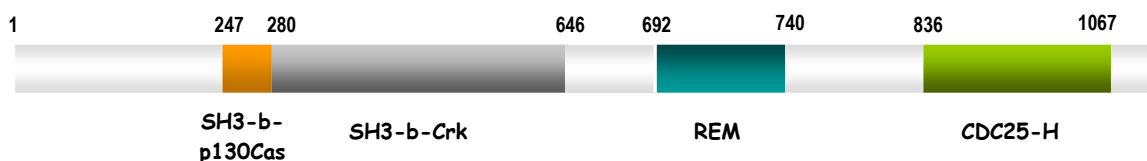
Figura 17: Comparación de genes y proteínas homólogas de C3G en diferentes especies. Alineamiento múltiple de las secuencias de genes y proteínas homólogas de C3G presentes en diferentes especies. Se muestra la estabilidad de las regiones conservadas evolutivamente REM y CDC-25H. Fuente: www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/50501.

Investigaciones posteriores han descubierto nuevas isoformas de C3G, como p87C3G (Gutierrez-Berzal et al. 2006), isoforma que carece del dominio N-terminal y de la primera región de poliprolinas del dominio SH3. Esta isoforma se encuentra sobre-expresada en líneas celulares de leucemia mieloide crónica (LMC).

7.2 Estructura

La proteína C3G consta de varios dominios modulares bien diferenciados entre sí, tanto estructural como funcionalmente. Estos dominios son comunes a otras proteínas GEF y algunos de ellos son esenciales para la unión específica a otras proteínas.

Figura 18: Representación de los dominios de C3G



Desde la región amino a la carboxilo se distinguen: dos dominios SH3-b a los que se unen el dominio SH3 de p130Cas y de Crk, respectivamente, un dominio REM (*Ras-Exchange-Motif*) y el dominio catalítico o CDC25-H.

En el extremo carboxi-terminal se encuentra la región catalítica característica de los GNRP o GEF de proteínas de la familia Ras. Esta secuencia presenta un 30-35 % de homología con GEFs de otros organismos, como por ejemplo, con CDC25 de *Saccharomyces cerevisiae*, o Ste6 de *Schizosaccharomyces pombe*, así como con GRF y Sos de mamíferos. Esta región es la responsable de la activación del intercambio de GDP por GTP (Fig. 18).

Otro dominio característico es la región REM (*Ras-Exchange-Motif*) que, en principio, se pensó que era responsable de la unión a Ras, al presentar varias argininas que también se encuentran en el dominio catalítico de CDC25 de levadura y de GRF1 de humanos y que podrían participar en la unión con los GEF (Fig. 18). Sin embargo, al estudiar la estructura tridimensional de Sos1 mediante difracción de Rayos X se vio que REM era un dominio hidrofóbico, donde se acoplaban los residuos I956 y F958 del dominio catalítico, estabilizando y abriendo la estructura de horquilla helicoidal adoptada por el sitio de unión del GTP, pero que no interaccionaba con Ras (Boriack-Sjodin et al. 1998).

En la región central de C3G (Fig. 18) está el dominio rico en prolina Pro-X-X-Pro, SH3-b (*SH3-binding*), a través del cual, se une a la proteína adaptadora Crk (Tanaka et al., 1994). En este dominio se han identificado cuatro secuencias CB detrás

de las secuencias consenso de poliprolinas, las cuales, siguen el patrón consenso de secuencias de unión al dominio SH3 de Crk y Grb2, como los de las proteínas Abl, Arg y Sos.

En posición amino respecto a la región de unión a Crk, se encuentra la región de unión al dominio SH3 de p130Cas (*Crk-associated substrate*) (Fig. 18), la cual, no tiene afinidad por otros dominios SH3, por tener otro orden de prolina diferente al de la secuencia consenso (Knudsen et al. 1994). Su secuencia consenso (XXPXKPX) se ha determinado mediante alineamiento con otras proteínas, que presentan dominios ricos en prolina que se unen al dominio SH3 de p130 Cas.

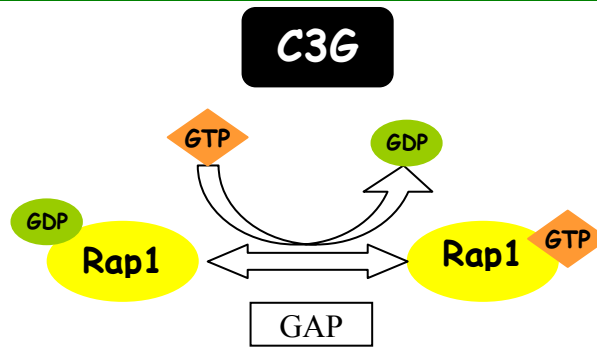
En el extremo N-terminal (aminoácidos 1-247) de C3G no se ha identificado ningún dominio definido, aunque se ha detectado que funciona como elemento regulador negativo en cis, reprimiendo la actividad catalítica de C3G. Esta represión se elimina al fosforilarse la Tyr 504. Existen otros posibles sitios de fosforilación en la estructura de C3G, que podrían regular su actividad mediante la acción de quinasas y/o fosfatasas (Ichiba et al. 1999).

También se ha detectado un dominio de unión a E-cadherina que comprende la región entre los aminoácidos 144-230, este dominio de C3G compite con β -catenina por la unión a E-caderina (Hogan et al. 2004).

7.3 Rutas de transducción de señales reguladas por C3G

C3G es un GEF de Rap1 y R-Ras (Gotoh et al. 1995; Gotoh et al. 1997), aunque también ejerce funciones a través de mecanismos independientes de su actividad como GEF. De hecho, C3G actúa como supresor de la transformación inducida por varios oncogenes incluido H-ras^{Lys12}, en parte, a través de la regulación negativa de la actividad de las ERKs por un mecanismo mediado por la fosfatasa PP2A que no requiere de su actividad como GEF (Guerrero et al. 1998; Guerrero et al. 2004; Martin-Encabo et al. 2007). Aunque la primera función que se le asignó a C3G en base al dominio catalítico que presenta en su extremo carboxilo terminal fue el de funcionar como un GEF para miembros de la familia Ras, C3G activa a Rap-1 y R-Ras, a pesar de estimular a otras GTPasas como H-Ras, N-Ras y RalA con menor eficiencia (Gotoh et al. 1995). Recientemente se ha descubierto un posible papel en la activación de algunos miembros de la familia Rho, como Cdc42 y TC-10 (Ehrhardt et al. 2002).

Figura 19. Ciclo de activación de Rap-1



Rap-1 se activa cuando se une a GTP y se inactiva cuando se une a GDP. Los GEFs como C3G facilitan la liberación de GDP y permiten la entrada de GTP. Los GAPs activan la capacidad GTPasa hidrolizando el GTP a GDP completando el ciclo. La estructura cristalizada de estas proteínas ha mostrado que existen 2 regiones switch 1 y switch 2 diferentes. Estas regiones permiten a los efectores de Rap-1 discriminar entre las formas unidas a GDP o GTP.

La proteína Rap1 es la principal diana de C3G. No obstante, Rap-1 puede ser activada por otros GEFs. Se ha demostrado que Rap-1 puede ser activado por varios receptores de membrana como receptores tirosina quinasas, Proteínas G heterotriméricas, receptores de citoquinas y moléculas de adhesión celular (revisado por Bos et al. 2001). Estudios farmacológicos han revelado que segundos mensajeros como AMP, Ca^{2+} y diacilglicerol (DAG) son los responsables de la transducción de señales extracelulares hasta Rap-1. Aparte de C3G, existen otros GEFs encargados de activar a Rap-1 en respuesta a estas señales:

- Epac1, Epac2 y Repac: activados por AMPc, lo que indicaría una posible implicación de PKA en la activación de Rap-1. CD-GEFI es el principal activador de Rap-1 en respuesta a Ca^{2+} , mientras que CD-GEFIII lo haría en respuesta a DAG.

- PDZ-GEFs. Son activados por AMPc, pero presentan menor afinidad por AMPc que la familia Epac, por lo que puede que sean activados por otros segundos mensajeros.

- Existen otros posibles GEFs como Nsp2 que presentan dominios de activación de Rap-1 aunque de momento no ha sido demostrado “in vitro” (revisado por Bos et al. 2001).

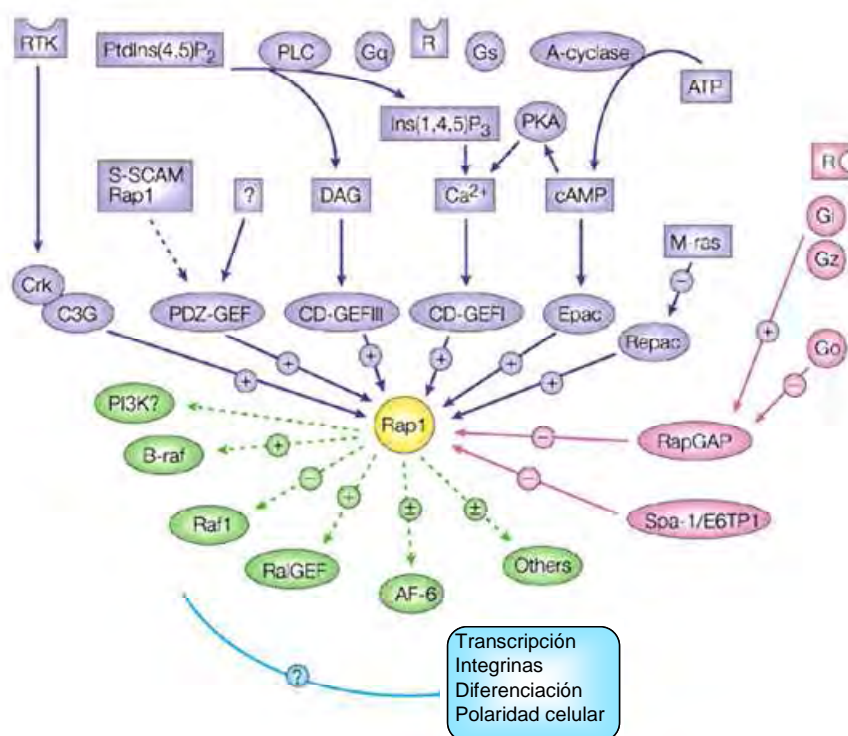
A su vez, la regulación negativa de las GTPasas, Rap-1 y R-Ras se llevará a cabo por proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP). Rap-1, presenta una baja actividad GTPasa intrínseca debido a que, a diferencia de otros miembros de la familia,

Ras no contiene el residuo de glutamina en la posición 61. Así que, la desactivación mediante GAPs es muy importante para mantener unos correctos niveles de activación de Rap-1. Los GAPs más importantes de Rap-1 son:

- Rap-1-GAPI y Rap-1-GAPII, los cuales son activados por la subunidad G_{α} de proteínas G heterotriméricas. Se ha demostrado que la subunidad $G_{\alpha o}$ inhibiría la actividad de estos GAPs manteniendo activo a Rap-1.
- E6TP1 es un miembro de la familia Spa1. Presenta un dominio PDZ, por lo que probablemente será activado por AMPc.
- GAP^{IP4BP} es activado por segundos mensajeros de inositol-1,3,4,5-tetrafosfato.
- Finalmente, también se ha demostrado que la Tuberina puede estimular la función GTPasa de Rap-1 (revisado por Bos et al. 2001).

Por otro lado, los factores inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs) bloquearían el intercambio de GDP por GTP (Vetter y Wittinghofer 2001).

Figura 20: Red de señalización de Rap1



Rap-1 es activado por varios estímulos extracelulares. La regulación de la activación de Rap-1 se realiza mediante diferentes GEFs (azul) y GAPs (púrpura). Una vez activado, Rap-1 modula la activación de muchos efectores (verde) (adaptado de Bos et al. 2001).

C3G ha sido implicado principalmente en dos rutas de transducción de señales dependientes de sus dos efectores, R-Ras y Rap-1: Ruta de las JNK y de las ERKs.

La ruta de JNKs se activa por R-Ras en respuesta a citoquinas y señales de estrés, y media la proliferación y la capacidad de crecer en ausencia de adhesión al sustrato (Tanaka et al. 1997).

La ruta de las ERKs se activa a través de Rap-1. Rap-1 activa la vía de las ERKs a través de la quinasa B-Raf. Esta ruta es activada por receptores tirosina quinasa como el EGF, el cual, activa transitoriamente a ERK1/2 a través de la formación del complejo proteico Shp2-Crk-C3G-Rap-1 (Nguyen et al. 1993), que tiene una vida corta, ya que, C3G está desfosforilado permitiendo la unión de la proteína adaptadora Cbl, la cual, inestabiliza el complejo. Por el contrario, el receptor de NGF mantiene fosforilado a C3G, por lo que no se une a c-Cbl (Kao et al. 2001). Además, Crk se mantiene fosforilado y unido a p130Cas, estabilizando el complejo Sh2-Crk-C3G-Rap-1, provocando una activación sostenida de ERK1/2 (Kao et al. 2001).

Por otro lado, existen datos en la literatura que muestran una regulación cruzada entre p38 MAPK y Rap-1, pero existen discrepancias al respecto. Por un lado, Rap-1 inhibe la activación de p38 MAPK inducida por Ras en líneas celulares procedentes de timoma (Stork 2005; Palsson et al. 2000), mientras que media en la activación de p38 MAPK inducida por FGF2 en células endoteliales (McDermott y O'Neill 2002). También, en respuesta a estímulos mecánicos, Rap-1 media la activación de p38 en MEFs a través de un mecanismo dependiente de MKK3/6 (Sawada et al. 2001). Sin embargo, nunca se habían descrito interacciones entre C3G y p38 MAPKs hasta el inicio de este trabajo y el del grupo de la Dra. Guerrero. Como se indicará más adelante, en colaboración con este grupo, hemos demostrado que C3G regula negativamente a p38 α MAPK a través de Rap-1 en células de leucemia mieloide crónica (Maia et al. 2009).

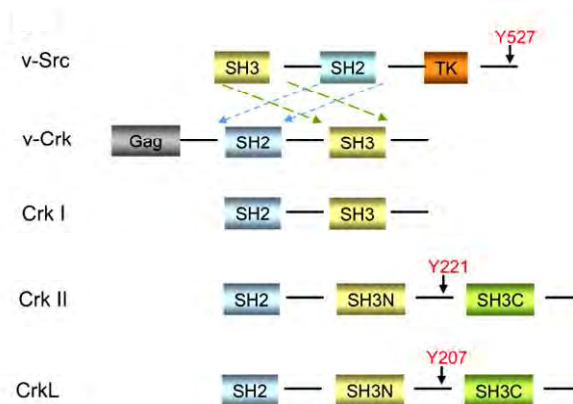
7.4 Interacciones con otras proteínas:

Se sabe que C3G interacciona con dos proteínas que contienen dominios SH3: Crk y p130Cas. En particular, Crk y C3G están asociadas constitutivamente formando complejos Crk-C3G, necesarios para la posterior activación de Rap-1.

Las proteínas Crk son proteínas adaptadoras que poseen dominios SH2 y SH3 (*Src-homology 2 y 3*), a través de los cuales interaccionan con otras proteínas como

p130Cas, paxilina, c-Cbl y Gab1, vía el dominio SH2, o Bcr-Abl, DOCK180, Abl, Sos y C3G, a través del SH3 (Alsayed et al. 2000).

Figura 21: Estructura de la familia de proteínas Crk



Representación esquemática de los dominios estructurales de la familia Crk. Se representan también los dominios de la proteína Src (adaptado de Feller 2001).

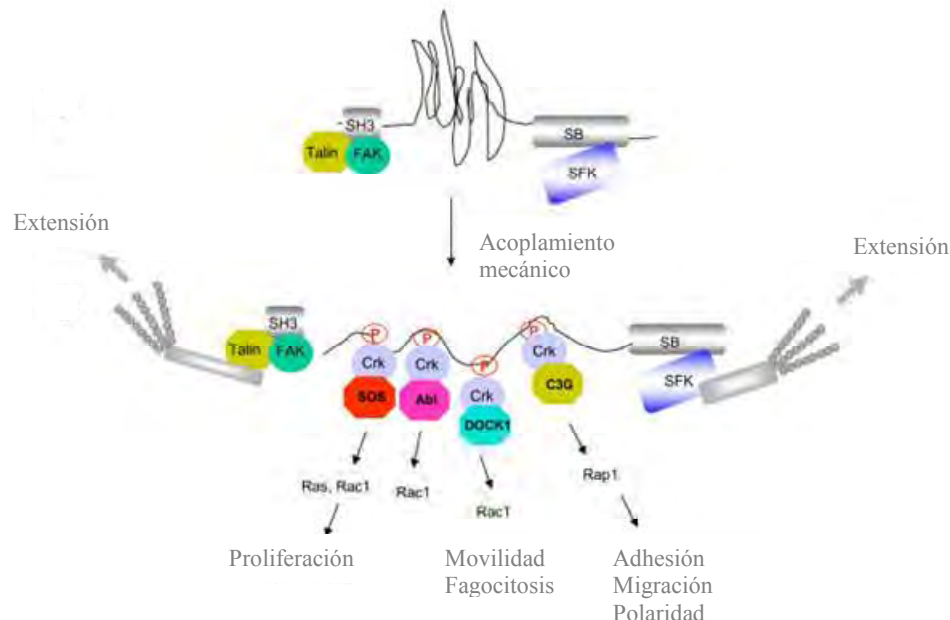
Los complejos C3G-Crk y C3G-CrkL están presentes en muchos tipos de células, aunque no está muy claro el mecanismo que regula la formación de los mismos. Se sabe que se forman en respuesta a la estimulación con insulina, a la activación de integrinas y en respuesta a otros estímulos (Okada y Pessin 1997, 1998; Buensuceso y O'Toole 2000; revisado por Feller 2001). Los sitios de unión se encuentran en el centro de ambas proteínas y corresponden a motivos P-x-x-P-x-K. A su vez, la formación del complejo Crk-C3G se regula por la fosforilación del residuo Y221 del dominio SH3 carboxilo de Crk (Okada et al. 1998), la cual, induce la disociación de C3G al unirse este residuo al dominio SH2 de Crk y replegarse la proteína (Feller et al. 1994). Está claro que existen otros mecanismos de regulación, dado que C3G también se une a la forma truncada, Crk I, carente del dominio donde se encuentra este residuo fosforilable.

La unión de C3G con Crk/CrkL a receptores activados y sus sustratos conduce a la redistribución de C3G en la célula, presumiblemente a zonas donde se encuentre su efector Rap-1 (revisado por Feller 2001). La proximidad de C3G a regiones con alta concentración de tirosina-quinasa puede hacer que C3G sea fosforilado en la Tyr 504, como ocurre frecuentemente en células transformadas con altas actividades tirosina-quinasa (Ichiba et al. 1999). Esta fosforilación modifica la actividad de C3G, pero no su interacción con Crk (Ichiba et al. 1999).

Las proteínas de la familia p130Cas son también proteínas adaptadoras. Presentan un dominio SH3 en su región amino terminal que les permite unirse a C3G (Kirsch et al. 1998). También recluta a muchas tirosina quinasas de la familia de FAK y Src, así como tirosina fosfatasas como PTP1B. Existen otros GEF que se unen a p130Cas, como es AND-34, el cual, activa a R-Ras, Rap1 y Ral (Birge et al. 2009).

C3G también establece interacciones con otras proteínas como la paxilina y Cbl. Cbl es una proteína adaptadora de 120 KDa que se une al dominio SH2 de Crk. La paxilina es una proteína de 68-70 KDa similar a p130Cas, que se fosforila en múltiples residuos de tirosina y funciona como un adaptador dentro del complejo formado en los focos de adhesión.

Figura 22: Características estructurales de las interacciones de p130Cas



El núcleo central es activado por fuerzas mecánicas. Una vez extendido se produciría la activación de Src, encargado de fosforilar los motivos YxxP. Posteriormente se produciría el reclutamiento de Crk a través de sus dominios SH2 junto con otras proteínas unidas al dominio SH3 de Crk (adaptado de Birge et al. 2009).

El reclutamiento de C3G a la membrana plasmática permite la unión de p130Cas a C3G, incrementándose en estas zonas la asociación de Rap-1-GTP a las integrinas tipo $\beta 1$, aumentando la afinidad de éstas por la matriz extracelular (revisado por Birge et al. 2009). La funcionalidad de C3G es potenciada por la fosforilación en la Tyr 504, mediada por SFK (*"Src Family protein Kinase"*). Es probable que la activación de C3G

coincida con su unión a p130Cas y con la activación inducida por Src en respuesta a la adhesión celular a la matriz extracelular o la estimulación con citoquinas o mecánica (Ichiba 1999). La fosforilación en tirosina de C3G da lugar a la translocación de C3G desde el citosol al citoesqueleto cortical de actina y a la región trans del Golgi. Esta relocalización sugiere que C3G está implicada en el tráfico y/o secreción de proteínas (revisado por Radha et al. 2004). También se ha demostrado que en neuronas el complejo p130Cas/Crk/C3G induce la activación de Rap-1. Esta proteína, forma un complejo estable con B-Raf que da lugar a la activación de la ruta de las ERKs, que media la diferenciación neuroblástica (York et al. 1998).

7.5 Funciones de C3G y/o Rap-1

Como hemos indicado anteriormente, C3G tiene acciones tanto dependientes como independientes de su actividad como GEF.

En base a los estudios con ratones deficientes en C3G, se ha visto que C3G es necesario para el desarrollo embrionario. Por ello, en los dos modelos existentes se produce una letalidad embrionaria, bien anterior al estadio E7.5 ó al E11.5, según el modelo, y los MEFs obtenidos presentan deficiencias en adhesión y aumento de migración (Ohba et al. 2001 y Voss et al. 2003).

La proteína Rap1, que es la principal diana de C3G, participa en la regulación de un amplio rango de funciones relacionadas principalmente con procesos de adhesión celular como son la morfogénesis, fagocitosis, interacciones célula-célula, migración, expansión y control de la morfología celular. Además, regula el crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Caron 2003; Zwartkruis y Bos 1999; Bokoch y Der 1993).

7.5.1. Adhesión, interacciones célula-célula y migración celular

C3G interviene en las interacciones proteicas que se producen en los focos de adhesión, que son estructuras que conectan las integrinas extracelulares con los filamentos de actina (Feller 2001), regulando así funciones celulares tales como adhesión celular, movilidad celular, arquitectura celular. Las integrinas activadas, dan lugar a la activación de tirosina quinasas como Src y FAK, que se translocan a la membrana y forman nuevos focos de adhesión. A éstos, se unen proteínas como paxilina y p130Cas, formando un complejo cuaternario, al que se unen múltiples proteínas como C3G, Abl, Csk, Cbl, Crk, Nck y otras proteínas de señalización celular

como Ras, PI3K, PKC, JNK (Woodside et al. 2001). Por ello, C3G generalmente promovería adhesión celular en respuesta a la estimulación por integrinas. De hecho, en MEFs obtenidos a partir de ratones deficientes en C3G se produce una disminución de la adhesión celular, desajustes de la expansión celular y aumento de la migración celular (Ohba et al. 2001).

C3G también interviene en las etapas iniciales de la formación de la unión célula-célula, gracias a su interacción directa con E-cadherina (Hogan et al. 2004). Esta unión es excluyente con la unión de β -catenina a E-cadherina, sugiriendo que C3G es relevante como iniciador de las uniones célula-célula y posteriormente sería desplazada por β -catenina, dando lugar a uniones maduras (Hogan et al. 2004). Rap-1, a su vez, puede ser activado por la internalización de E-cadherina (Balzac et al. 2005), dado que C3G se mantendría unido a E-cadherina y se promovería de nuevo la translocación de E-cadherina.

También se ha demostrado la implicación de C3G en la activación de Rap-1 en respuesta al ensamblaje de nectinas, que son responsables de la formación de las uniones adherentes. Las moléculas de nectina se unirían a c-Src en las zonas de adhesión célula-célula, causando el reclutamiento de C3G (Fukuyama et al. 2005).

Con respecto a la migración parece que la competencia entre C3G y DOCK180 por unirse a CrkII sugiere un posible balance entre Rac-1 y Rap-1 para controlar la migración celular (Valles et al. 2004). En fibroblastos deficientes en C3G hay un aumento de la migración celular, que podría estar mediada por cambios en la activación de Rap1 (Ohba et al. 2001).

7.5.2 Apoptosis y supresión tumoral

Inicialmente, la proteína Rap1 fue descubierta como un antagonista de la transformación inducida por oncogenes tales como K-ras (Sakoda et al. 1992). Este efecto posiblemente se debe a la similitud estructural entre Ras y Rap-1, que genera una disminución de la actividad de Ras por secuestro de efectores y activadores. Paralelamente a este efecto de C3G dependiente de su actividad sobre R-Ras y/o Rap1, se ha demostrado que la sobreexpresión de C3G inhibe la transformación mediada por varios oncogenes como sis, v-raf 1, dbl y R-ras por un mecanismo independiente de su dominio catalítico, y por tanto, de la activación de Rap1 y R-Ras (Guerrero et al. 1998; Guerrero et al. 2004). En concreto, el dominio de unión a Crk es el responsable de la

actividad supresora de tumores. Este efecto se debe en parte a la inhibición de la proliferación celular (Guerrero et al. 1998; Guerrero et al. 2004), aunque podría también estar mediado por un aumento en la apoptosis. De hecho, C3G regula negativamente la ruta de supervivencia de las ERKs por un mecanismo mediado por PP2A (Guerrero et al. 1998; Guerrero et al. 2004), y la ruta de la PI3K/Akt (Voss et al. 2006). Además, se ha demostrado que C3G juega un papel como mediador de apoptosis en células hematopoyéticas (Shivakrupa et al. 2003).

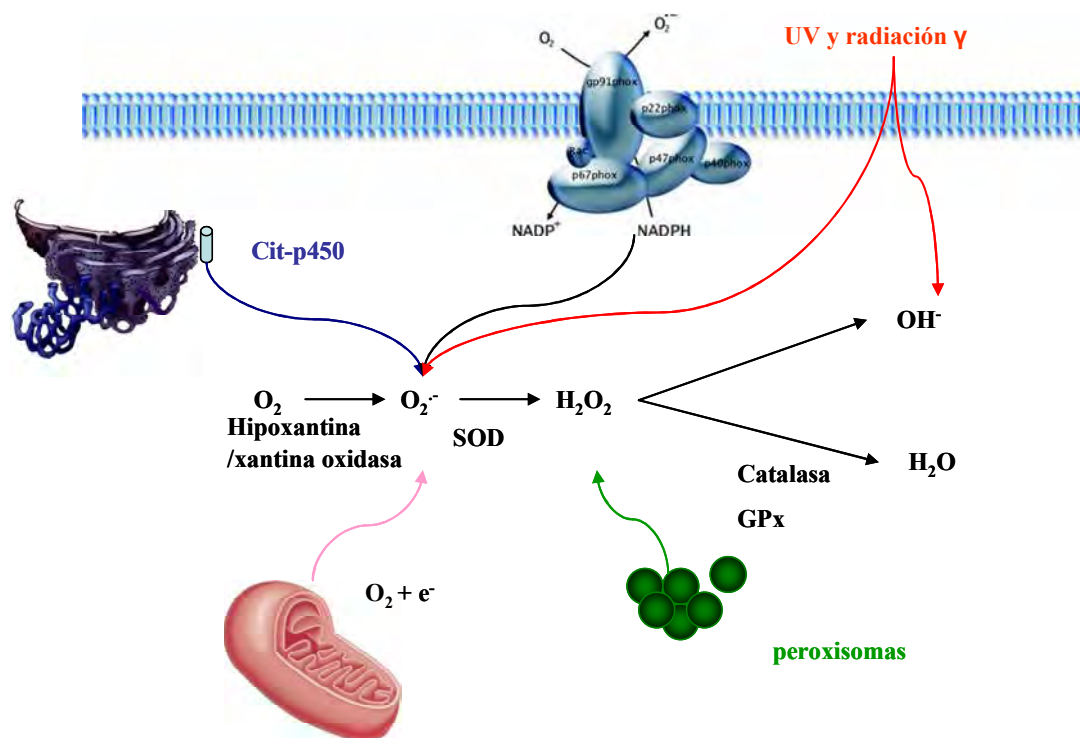
Por el contrario, en líneas celulares de neuroblastoma C3G induce supervivencia en respuesta a la retirada de suero (Radha et al. 2008). En relación con esto, en colaboración con el grupo de la Dra. Guerrero, hemos demostrado que tanto la sobreexpresión como el silenciamiento de C3G en la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica (LMC) inducen apoptosis, siendo esencial la activación de p38 α mediada por Rap-1 (Maia et al. 2009).

8. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) comprenden una serie de metabolitos reducidos de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el anión superóxido (O₂⁻) o el radical hidroxilo (OH⁻), que poseen mayor reactividad que el oxígeno. Se generan en la célula a través de distintas rutas de señalización (revisado por Valko et al. 2006).

El metabolismo energético celular se basa en la producción de ATP a través de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, en la cual una molécula de oxígeno capta electrones y protones y es eventualmente reducida a agua (H₂O). Durante este proceso, a veces, se transfiere un electrón a la molécula de O₂, generándose el anión superóxido. Alrededor de un 1 o 2% de los electrones se usan para generar O₂⁻ en reacciones mediadas por la coenzima Q, la ubiquinona y sus complejos. Por lo tanto, la mitocondria es una de las mayores fuentes de producción de ROS de la célula (revisado por Raha y Robinson 2001).

Figura 23: Fuentes de producción de ROS



Las ROS son producidas por el metabolismo celular a través de distintas rutas que pueden implicar el retículo endoplasmático tanto rugoso como liso, la mitocondria y la membrana plasmática. También pueden ser producidos por estímulos extracelulares. Anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión hidroxilo (OH^-).

Además existe otra cadena transportadora de electrones en el retículo endoplasmático, en la que se genera O_2^- a través de la NADH citocromo p450 reductasa (Fig. 23). Por otra parte, el O_2^- también puede ser generado por la Hipoxantina/xantina oxidasa, por la NADPH oxidasa de la membrana plasmática, por la lipooxigenasa o por la ciclooxigenasa (revisado por Mates et al. 1999; Mates y Sanchez-Jimenez 1999). Igualmente, algunos estímulos extracelulares como la radiación UV pueden inducir la producción de ROS por diferentes mecanismos (Fig. 23).

Las ROS han sido implicadas generalmente en daño celular, aunque también juegan un importante papel como elementos de regulación y señalización intracelular. Se ha demostrado que interfieren con la expresión de un alto número de genes y rutas de señalización celular (revisado por Valko et al. 2006). El estado redox de la célula, va a depender de la presencia de ROS y de enzimas antioxidantes. Este estado redox puede causar una respuesta positiva (proliferación) o negativa (parada de ciclo o muerte celular). Mientras que altas concentraciones de ROS suelen causar muerte celular, bajas

concentraciones pueden estimular la proliferación y la supervivencia en muchos tipos de células (revisado por Valko et al. 2006).

Como mecanismo de defensa frente a los altos niveles de ROS, las células poseen un complejo sistema de enzimas antioxidantes o reductoras que mantienen el estado redox intracelular en un estado reducido. Entre estas enzimas, cabe destacar las siguientes (revisado por Valko et al. 2006; Kamata y Hirata 1999):

1-Super-óxido-dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1): Cataliza la conversión del O_2^- a O_2 o a H_2O_2 . Existen varias isoformas que difieren principalmente en la naturaleza del metal presente en su centro activo. En humanos hay 3 isoformas:

- Citosólica o Cu/Zn SOD o SOD1
- Mitocondrial o Mn SOD o SOD2
- Extracelular o EC-SOD o SOD3

2-Catalasa (EC 1.11.1.6): Está presente en todos los organismos aerobios. Se localiza en los peroxisomas, donde cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno molecular de una manera muy eficiente.

3-Glutatión peroxidasa: Utiliza como sustrato un tripéptido denominado glutatión. Existen dos formas de la enzima:

- Independiente de selenio. Glutatión-S-transferasa o GST (EC 2.5.1.18).
 - $RX + GSH \rightarrow HX + R-S-GSH$
(R puede ser un grupo alifático, aromático o un heterociclo; X puede ser un grupo sulfato o nitrato)
- Dependiente de selenio. Glutatión peroxidasa o GPx (EC 1.11.1.19).
Compite con la catalasa por el peróxido de hidrógeno y es la principal enzima protectora frente a bajos niveles de estrés oxidativo:
 - $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2 H_2O$
 - $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$

Además, existen numerosos antioxidantes no enzimáticos, que agrupan un amplio grupo de sustancias con función protectora frente a las ROS como la vitamina C, la vitamina E, el glutatión, el ácido lipoico, los carotenos y los compuestos flavonoides.

8.1 Papel de las especies reactivas de oxígeno en los procesos de apoptosis

Existen abundantes evidencias de que las ROS participan en la apoptosis. De hecho, algunos mediadores de apoptosis son oxidantes o estimuladores del metabolismo oxidativo e inducen la producción de ROS. Incluso se ha demostrado que el tratamiento celular con ROS como el H_2O_2 es capaz de inducir apoptosis (Liu et al. 1999). En algunos casos, niveles moderados de estrés oxidativo inducen apoptosis, mientras que niveles altos de estrés oxidativo desencadenan un proceso de necrosis celular (revisado por Kamata y Hirata 1999). De acuerdo con esto, algunos procesos de apoptosis pueden ser inhibidos por la adición de antioxidantes.

Aunque la implicación de las ROS en la apoptosis es clara, todavía no hay suficientes datos para determinar, si las ROS juegan un papel central en la inducción de apoptosis o si son una consecuencia del proceso de muerte celular en algunos casos (revisado por Fruehauf y Meyskens 2007).

Muchos de los estímulos de apoptosis, provocan la liberación del citocromo c de la mitocondria, acompañada de un descenso del potencial de membrana mitocondrial y la apertura del poro de transición y/o del canal de iones dependiente del voltaje de la membrana mitocondrial. Esta apertura está regulada por el estado redox de la célula y genera una salida de O_2^- del interior de la mitocondria aumentando el estrés oxidativo (revisado por Garrido et al. 2006).

Las ROS son capaces de disminuir los niveles de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 como la propia Bcl-2 a través de la regulación de su fosforilación y/o ubiquitinación, lo cual genera un aumento de la actividad de las proteínas proapoptóticas como Bax y Bad (Li et al. 2004). También se ha propuesto que la actividad antiapoptótica de Bcl-2 podría depender de su funcionamiento como un antioxidante, regulando los niveles de ROS (Cai et al. 1998).

En algunos casos, se ha demostrado que las ROS inducen apoptosis a través de diversos mecanismos como la producción de ceramidas, la activación de la ruta de las JNKs, la activación de p53 o la regulación de la subunidad p85 de la PI3K (revisado por Kamata y Hirata 1999). Nuestro grupo también demostró la importancia de las ROS en la apoptosis inducida por cisplatino en la línea tumoral HCT116 a través de la activación de p38 MAPK (Bragado et al. 2007).

8.2 Papel de las especies reactivas de oxígeno en cáncer

La batería de enzimas antioxidantes protege a la célula de la alta concentración de ROS, pero una alta concentración de ROS debido a deficiencias en alguna de las enzimas o por un metabolismo descontrolado puede generar la acumulación de ROS intracelulares. La acumulación de ROS puede provocar modificaciones en el DNA y está relacionada, tanto con la iniciación del tumor como con la transformación maligna (revisado por Valko et al. 2006).

Las células tumorales presentan unos niveles altos de estrés oxidativo como ocurre por ejemplo en células tumorales humanas procedentes de melanoma, cáncer de mama o de fibrosarcoma (Dolado et al. 2007). Este nivel de estrés está asociado a la transformación inducida por oncogenes, aumento de la actividad metabólica, mal funcionamiento de la mitocondria, aumento en la producción de ROS (revisado por Pelicano et al. 2004) e incluso a alteraciones de las enzimas antioxidantes (Dolado et al. 2007). En ese sentido, se ha demostrado que algunos oncogenes, como H-ras, inducen la producción de ROS, las cuales, activan a p38 α , dando lugar a la activación de la apoptosis e inhibición de la tumorigénesis (Dolado et al. 2007). Incluso se ha relacionado el nivel de ROS intracelular con el potencial tumorigénico, pero no con una mayor capacidad de invasión (Dolado et al. 2007).

Todos estos resultados apoyan la conexión existente entre cáncer y estrés oxidativo.

Antecedentes del grupo

ANTECEDENTES DEL GRUPO

Las rutas de transducción de señales mediadas por las MAPKs se encuentran entre los mecanismos de regulación celular más ampliamente extendidos. Todas las células eucariotas poseen múltiples vías de MAPKs, cada una de las cuales, responde preferentemente a distintos tipos de estímulos. Estas múltiples rutas de MAPKs permiten a la célula generar una respuesta rápida y coordinada a la multitud de estímulos divergentes recibidos (Kyriakis y Avruch 2001). Como se ha comentado en la introducción, existen tres grandes subfamilias de MAPKs: ERKs, JNKs y p38 MAPKs. Las p38MAPKs fueron identificadas como quinasas de estrés, pero también son activadas por otras señales y regulan múltiples funciones celulares, incluida la muerte celular por apoptosis.

El papel de las p38MAPKs como reguladoras de los procesos de apoptosis parece depender del estímulo y del tipo celular (revisado por Nebreda y Porras 2000). Durante muchos años, la mayor parte de los datos disponibles en la literatura, se basaban en el uso de inhibidores químicos de p38 α y p38 β , como el SB203580 o el SB202190, o en la sobreexpresión de mutantes activos de p38 o de sus activadores (MKK3/6). Estas aproximaciones han generado cierta controversia en su intento de establecer el papel específico de las diferentes isoformas, por lo que ha sido esencial el uso de líneas celulares deficientes en cada una de las isoformas para definir el papel específico de cada una de ellas.

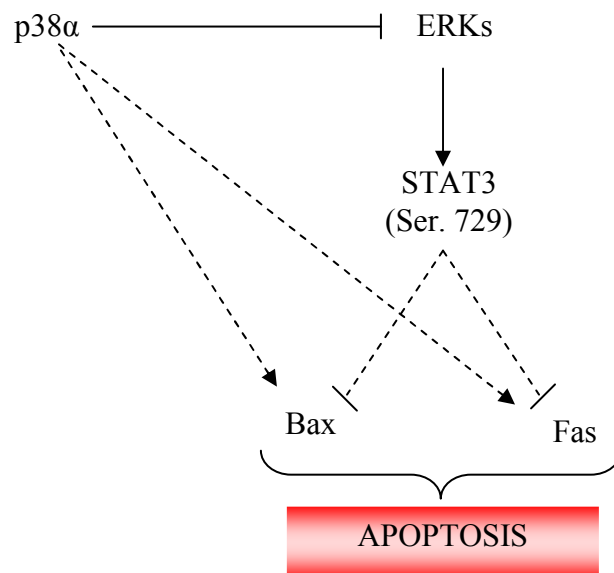
Nuestro grupo se ha centrado fundamentalmente en el estudio de la ruta de p38 α MAPK y sus interacciones con otras rutas, así como su efecto sobre la regulación del balance apoptosis/supervivencia. Para ello, se han utilizado principalmente líneas celulares derivadas de cardiomiocitos y fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en p38 α MAPK, así como sus controles respectivos. No obstante, en algunos casos se ha realizado un silenciamiento específico de p38 α .

En primer lugar, nuestro grupo demostró que p38 α MAPK sensibiliza a los cardiomiocitos y a los fibroblastos a la apoptosis inducida por diferentes estímulos pro-apoptóticos como son la retirada de suero, el tratamiento con radiación UV o con el ionóforo de calcio A23187 (Porras et al. 2004).

Para conocer los mecanismos moleculares responsables de la menor apoptosis de las células deficientes en p38 α , se analizó el patrón de expresión de proteínas pro y

antiapoptóticas, observándose una menor expresión de las proteínas proapoptóticas Fas y Bax en los cardiomiocitos deficientes en p38 α (Porras et al. 2004). De hecho, se vio que p38 α regulaba positivamente la transcripción y/o la estabilidad de sus mensajeros. Además, dado que los niveles de la forma fosforilada en Ser729, y más activa, de STAT-3 eran más elevados en las células deficientes en p38 α MAPK, STAT-3 podría contribuir a regular negativamente la expresión de Fas y Bax. Este incremento de P-Ser-STAT-3 en las células sin p38 α era consecuencia de una mayor activación de la ruta de las ERKs, que también contribuía a la mayor supervivencia de estas células (Porras et al. 2004).

Figura 24: p38 α sensibiliza a los cardiomiocitos y fibroblastos a la apoptosis



Esquema simplificado de los mecanismos moleculares regulados por p38 α que conducen a la mayor sensibilidad a la apoptosis por diferentes estímulos. p38 α regula positivamente la expresión de proteínas proapoptóticas como Bax o Fas y regula negativamente la vía de supervivencia de las ERKs, que a través de la fosforilación de STAT3 también reprimiría la expresión de Bax y Fas.

Por tanto, todos estos datos indicaban que la p38 α sensibiliza a los cardiomiocitos y fibroblastos a la apoptosis, tanto a través de una regulación positiva de la expresión de proteínas proapoptóticas como a través de la inhibición de la vía de supervivencia de las ERKs.

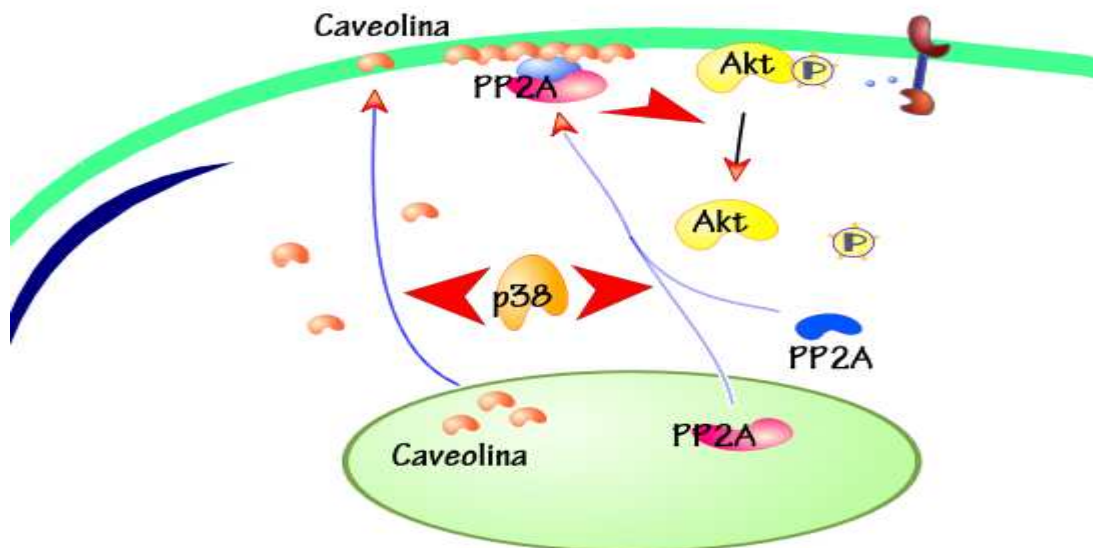
Por otro lado, las células deficientes en p38 α MAPK también presentaban una mayor activación de la Akt, otra ruta de supervivencia, a pesar de que el nivel de

activación de PI3K era igual que en las células con p38 α (Zuluaga et al. 2007). De hecho, esta mayor activación de Akt era dependiente de la menor actividad de la fosfatasa PP2A en estas células en la fracción caveolar debido a una localización diferencial de PP2Ac (Zuluaga et al. 2007). Esta diferente distribución subcelular de PP2Ac dependiente de p38 α MAPK, sitúa una fracción importante de la fosfatasa activa en las caveolas en las células de fenotipo salvaje, gracias a su interacción con caveolina-1. Estas regiones de membrana son importantes para la activación de Akt y de hecho, su nivel en esta fracción es elevado (revisado por Saltiel y Pessin 2003), lo que facilitaría unos niveles más altos de desfosforilación de Akt por PP2A (Zuluaga et al. 2007).

La formación de estos complejos era dependiente de una correcta organización de las caveolas, por lo que se las interacciones entre PP2A y caveolina-1 se perdían al despegar las células del sustrato, así como con un tratamiento con β -metil-ciclo-dextrina, compuesto que desencadena la depleción del colesterol celular.

Al realizar estos estudios sobre la interacción entre PP2Ac y caveolina-1, se observó la presencia de Rac-1 en los inmuprecipitados de caveolina-1 de los cardiomiocitos que expresan p38 α mantenidas sin suero, de una forma dependiente de p38 α , por lo que decidimos analizar en detalle la regulación de Rac-1 por p38 α MAPK y su función, como se presentará en esta memoria.

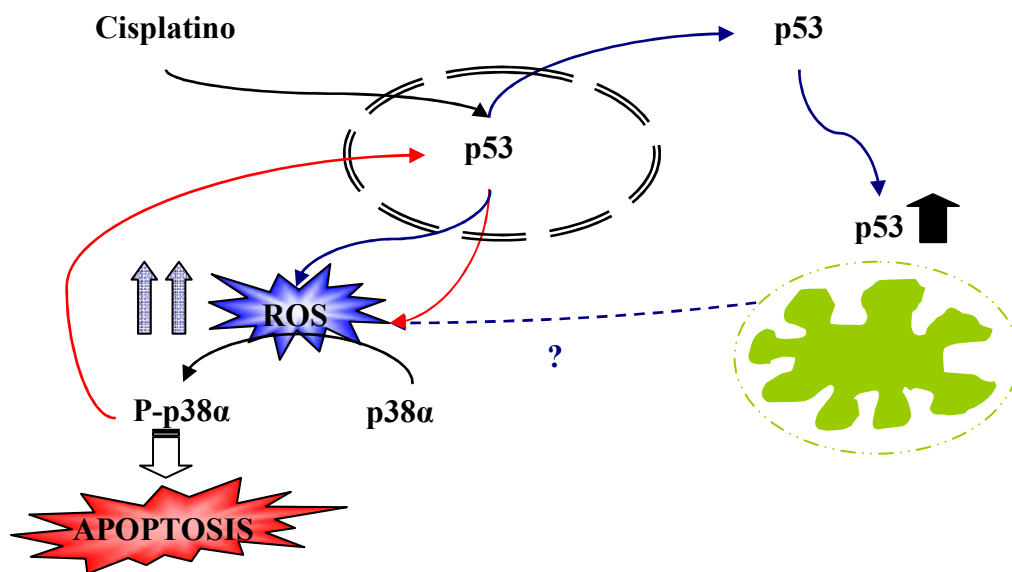
Figura 25: Regulación negativa de Akt por p38 α



p38 α induce la formación de complejos caveolina-1-PP2A en regiones de membrana. La localización de la fosfatasa PP2A en estas regiones de membrana facilitaría unos mayores niveles de desfosforilación de Akt.

Para profundizar más en el conocimiento del papel de p38 α como regulador de los procesos de apoptosis, también se analizaron en nuestro grupo las interrelaciones entre la ruta de p53 y la de p38 α en respuesta a agentes antitumorales en células derivadas de carcinoma de colon (HCT116). En particular, en la apoptosis inducida por cisplatino en células HCT116 se vio que p38 α era esencial y que requería de la presencia de p53. De hecho, dicho proceso de apoptosis implicaba la producción de ROS por un mecanismo dependiente de p53, y a su vez, estas ROS eran necesarias para activar p38 α dando lugar a la muerte de las células (Bragado et al. 2007). Además, una vez activada, p38 α era capaz de fosforilar y activar a p53, generándose así un mecanismo de retroalimentación positivo que amplifica la señal. Sin embargo, todo este mecanismo de inducción de apoptosis no era operativo en respuesta a otros agentes quimioterapéuticos como el 5-fluoruracilo o la doxorubicina, lo que indica que hay una especificidad de señal (Bragado et al. 2007).

Figura 26: Mecanismo de acción del cisplatino en las células HCT116



El cisplatino induce la cascada p53/ROS/p38 α . Una vez activada la p38 α regula positivamente los niveles y fosforilación de p53, creando un ciclo de retroalimentación positivo que amplifica la señal inducida por cisplatino.

Por otro lado, en relación con estos estudios se analizó el papel de p38 α en la apoptosis inducida por estrés oxidativo utilizando H₂O₂ como estímulo. Se pudo observar que una dosis baja de H₂O₂ inducía una mayor apoptosis en los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) que expresaban p38 α a tiempos cortos, mientras que a

tiempos más largos los MEFs deficientes en p38 α tenían unos niveles de muerte celular muy superiores (datos no publicados del grupo). Por ello, decidimos analizar los mecanismos que pudieran mediar esa mayor supervivencia de las células con p38 α en respuesta a estrés oxidativo, cuyos resultados se muestran en esta memoria.

Otra cuestión interesante que se derivaba de nuestros estudios sobre la regulación de PP2A por p38 α , era la posible interacción con otras rutas y su implicación en la regulación de los procesos de muerte. En ese sentido, sabíamos que C3G al igual que p38 α regulaba negativamente a Akt, a través de un mecanismo dependiente de PP2A (Voss et al. 2006; Martin-Encabo et al. 2007), por lo que ambas proteínas podrían estar actuando a través de una ruta común. Además, había datos en la bibliografía que indicaban que Rap-1, el principal efector de C3G, podía regular a p38 MAPK tanto de forma positiva como negativa (Stork 2005; Palsson et al. 2000; McDermott y O'Neill 2002). Por todo ello, se han estudiado las interacciones funcionales entre p38 α y C3G en relación con la apoptosis y los resultados se exponen en esta memoria.

Objetivos

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de investigación es la caracterización de las interacciones entre la ruta de la p38 α MAPK y de las rutas de Rac-1 y de C3G en respuesta al estrés, así como su implicación funcional utilizando cardiomiocitos y fibroblastos procedentes de ratones deficientes en p38 α MAPK.

Este objetivo general se desglosa en unos objetivos concretos:

1. Caracterización del papel de p38 α MAPK en la regulación de Rac-1 utilizando líneas celulares de cardiomiocitos embrionarios deficientes en p38 α :
 - 1.1. Análisis del papel de p38 α en la regulación de la actividad de Rac-1
 - 1.2. Determinación del papel de p38 α en la regulación de la localización subcelular de Rac-1 y de su interacción con caveolina-1
 - 1.3. Estudio de la función de Rac-1 en la adhesión celular regulada por p38 α
2. Análisis del papel de C3G en la regulación de la actividad de p38 α en respuesta a estrés y su implicación en la regulación del balance supervivencia/apoptosis utilizando líneas de fibroblastos embrionarios deficientes en p38 α :
 - 2.1. Análisis del papel de C3G en la regulación de la actividad de p38 α MAPK en respuesta a estrés. Implicaciones de Rap-1
 - 2.2. Estudio del papel que juega la ruta C3G/p38 α en la regulación del balance apoptosis/supervivencia. Análisis de los mecanismos moleculares implicados
3. Caracterización del papel de p38 α MAPK en la regulación de la muerte celular por estrés oxidativo utilizando líneas de fibroblastos embrionarios deficientes en p38 α :
 - 3.1. Estudio de la regulación de la ruta de mTOR/p70S6K por p38 α y de su función en la supervivencia celular
 - 3.2. Análisis de la expresión de enzimas antioxidantes dependiente de p38 α

Material y métodos

1. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LAS DIFERENTES LÍNEAS CELULARES

Las líneas de cardiomiocitos utilizadas fueron obtenidas a partir de embriones de estadio E9.5, generados por el cruce de ratones heterocigotos para el gen de p38 α y ratones transgénicos que llevaban incorporada una construcción del brazo largo del antígeno T del virus SV40 (LTA γ) bajo un promotor inducible por IFN- γ y por temperatura (a 33°C). Se obtuvieron embriones +/+, +/- y -/- para p38 α expresando la construcción con el LTA γ . A partir de ellos, por tripsinización de los corazones, se aislaron cardiomiocitos, eliminándose los fibroblastos mediante pre-plaqueo en placas de cultivo sin tratar. El sobrenadante enriquecido en cardiomiocitos era sembrado en platos colagenizados, manteniéndose las células a 33°C y con IFN- γ para obtener líneas inmortalizadas de cardiomiocitos (Adams et al. 2000).

El mantenimiento de estas líneas de cardiomiocitos se realizaba en platos de cultivo tratados con colágeno (Roche, Ref.1179179), en un medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal (FBS, de Gibco), IFN- γ (10U/ml, Sigma) y cardiotrofina-1 (0.2ng/ml, R&D systems). Se crecían en un incubador a 33° C, en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Para realizar los experimentos, estas células se transferían a 37°C y se mantenían sin IFN- γ durante 24-48 h con el fin de suprimir la expresión de AgT para evitar su interferencia en los experimentos.

Las líneas de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) fueron obtenidas a partir de embriones de estadio E10.5 p38 α +/+ (wt) y deficientes en p38 α (-/-). Se aislaron fibroblastos mediante tripsinización y posteriormente, se inmortalizaron utilizando dos métodos diferentes. Por un lado, fueron inmortalizados por sucesivos pases en cultivo. Otro método utilizado fue la inmortalización por infección con partículas retrovirales que contenían una construcción del brazo largo del antígeno T del virus SV40 (Ramsauer et al. 2002).

A partir de las líneas inmortalizadas por pases, se obtuvieron MEFs wt y p38 α -/- con silenciamiento génico estable de C3G mediante transfección con una construcción que

lleva el shRNA para C3G en el vector pRetro Super Puro (pRS), y posterior selección con puromicina (1 µg/ml) hasta conseguir obtener diferentes clones.

Las líneas de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) deficientes en C3G, fueron generadas a partir de fibroblastos deficientes en C3G (obtenidos de embriones de ratón de estadio E12.5) rescatados con una construcción que contenía el cDNA de C3G humano, con los exones 15 y 16 flanqueados por secuencias loxP. A partir de estos MEFs cedidos por el Dr. Matsuda, se realizó una infección con un adenovirus capaz de expresar la recombinasa Cre bajo el control del promotor CMV (Ad-CMV-Cre) (Vector Biolabs, Philadelphia USA) para delecionar dichos exones (15 y 16), eliminando así la expresión de la proteína C3G. Las células fueron sembradas 24 horas antes a una dilución que garantizara una confluencia del 80% en el día de la infección. Los virus fueron diluidos en D-MEM suplementado con polybrene 2,5µg/ml. El medio de cultivo de crecimiento fue reemplazado por la mezcla de D-MEM y virus (0,5 ml/pocillo en una placa multipocillo 3x4) y se incubaron las células en este medio durante 1 hora con agitación ocasional. Tras esta incubación se añadía medio de crecimiento hasta completar los volúmenes normales utilizados en este tipo de placas. A las 48 horas de la transfección, las células fueron tripsinizadas y sembradas siguiendo protocolos de dilución límite. Se seleccionaron 50 clones, los cuales fueron expandidos y genotipados para identificar la delección de los exones 15 y 16 del C3G humano por la recombinasa Cre (ver protocolo de genotipaje) mediante PCR usando oligonucleótidos específicos.

Los clones con una clara delección de C3G (8 clones) fueron utilizados para la caracterización de estas células deficientes en C3G, aunque luego se utilizaron clones representativos para el resto de los experimentos. Estos MEFs se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo que el resto de los MEFs, evitando un número de pases superior a 10.

Al llegar a confluencia todas las líneas celulares se tripsinizaban con tripsina 0,25%-EDTA 0,02%, parándose la acción de la misma con DMEM-10% FBS y se repartía la suspensión celular entre varias placas, poniendo la densidad celular adecuada según las necesidades de cada experimento. A su vez, los experimentos se realizaban a confluencia o subconfluencia dependiendo del tipo de experimento.

Tabla resumen de líneas celulares:

Denominación	Variantes	shRNA /AdenoCre	Organismo	Características	Condiciones de cultivos
Cardiomiocitos	wt	-	Mus musculus E9,5	-	DMEM Cardiotrofina Interferón γ 33° C
	p38 α -/-	-		Sin expresión de p38 α	
Fibroblastos inmortalizados mediante pases	wt	pRSv	Mus musculus E10,5	-	DMEM 37° C DMEM 37° C
		pRS shC3G		Sin expresión de C3G	
	p38 α -/-	pRSv	Mus musculus E10,5	Sin expresión de p38 α	
		pRS shC3G		Sin expresión de p38 α /C3G	
Fibroblastos inmortalizados con AgT	wt	-	Mus musculus E10,5	-	DMEM 37° C
	p38 α -/-	-		Sin expresión de p38 α	
Fibroblastos inmortalizados con AgT	wt	-	Mus musculus	-	DMEM 37° C
	MKK3 -/-	-		Sin expresión de MKK3	
	MKK6 -/-	-		Sin expresión de MKK6	
Fibroblastos inmortalizados con AgT	wt	-	Mus musculus E12,5	Sin expresión de C3G _m Expresión de C3G _h	DMEM 37° C
	C3G -/-	AdenoCre		Sin expresión de C3G _m /C3G _h	

2. TRATAMIENTOS CELULARES

2.1. Estímulos de estrés y/o apoptóticos

- Retirada de suero durante periodos de 24-48 h.
- Tratamientos con H₂O₂ (estrés oxidativo) a diferentes dosis (0,1-5 mM) y tiempos (20 minutos-24 horas).
- Tratamientos con NaCl 0,5 M (estrés omótico) a diferentes tiempos.

2.2. Estímulos de supervivencia

- Adición de 10% de suero fetal bovino (FBS) al medio celular durante distintos periodos de tiempo, comprendidos entre 5 minutos y 48h.

2.3. Inhibidores de diferentes vías de señalización

- Rapamicina, inhibidor de mTOR, que se usó a una concentración final de 40nM para inhibir la actividad quinasa y 1-5 μ M para estudios de viabilidad celular.
- SB203580, inhibidor de p38 α/β , que se usó a una concentración final de 5 μ M para inhibir fundamentalmente a la isoforma α .
- Para eliminar el colesterol celular y dar lugar así a la ruptura de las caveolas se empleaba la β -metil-ciclodextrina (Sigma, M7439), a una dosis final de 10 mM.

3. CONGELACIÓN, DESCONGELACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las células se almacenaban congeladas en suero fetal bovino suplementado con un 10% de DMSO en un crioprotector con nitrógeno líquido a -170° C. Para congelarlas, éstas se lavaban con PBS y seguidamente se tripsinizaban con 0,25% tripsina-0,02% EDTA (Gibco, 05543). La acción de la tripsina se paraba al añadir suero fetal con 10% DMSO. Las células así resuspendidas se pasaban a un vial de crioprotección, que se congelaba progresivamente: primero se mantenía a -20° C durante 20-30 min y posteriormente, a -80°C durante 12-16h Finalmente, se introducían en el nitrógeno líquido.

La descongelación se realizaba de forma rápida, pasando los viales directamente del nitrógeno líquido a un baño a 37-40° C. Una vez descongeladas, las células se sembraban en placas de cultivo en las que previamente se había adicionado el medio adecuado.

4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES TOTALES

Las células se lavaban con PBS frío y se añadía un tampón de lisis con la siguiente composición:

Tampón de lisis	
Tris HCl (pH 7,5)	5 mM
NaCl	150 mM
NP40	1 %
EGTA	5 mM
EDTA	5 mM
NaF	20 mM
NaVO ₃	1 mM
PMSF	1 mM
Leupeptina	1 µg/ml
Aprotinina	1 µg/ml

Posteriormente, las células se levantaban de la placa con un rascador de plástico y se recogían en un tubo eppendorf, manteniéndolas a 4°C durante 20 min, agitando 20 segundos cada 5 min. Se centrifugaban a 13.000 rpm. durante 10 min a 4°C y se recogía el sobrenadante, desechando el sedimento con restos de membranas celulares. Se separaban distintas alícuotas, que se conservaban a -80°C.

5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La valoración de la concentración de proteínas, se realizaba por el método descrito por Bradford en 1976. El procedimiento consistía en la adición de 1 µl de la muestra problema a una disolución de reactivo Bradford diluido en agua ultrapura 1/5. Tras un tiempo de incubación de, al menos, 5 min, se medía su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Para conocer la concentración de proteína interpolábamos el valor de absorbancia obtenido en una recta de calibrado realizada con concentraciones conocidas de albúmina.

6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT E INMUNODETECCIÓN

Las proteínas de los extractos celulares se separaban por electroforesis utilizando geles Anderson, que carecen de SDS. Se utilizó un gel separador del 15%, para el análisis de proteínas de pesos moleculares de 30-80 KDa, del 20% para aquellas de tamaño menor de 30 KDa. y del 7,5% las de tamaño superior o igual a 100 KDa. En todos los casos, la composición del gel concentrador era la misma. La composición de los geles fue la siguiente:

	SEPARADOR 7,5%	SEPARADOR 15%	SEPARADOR 20%	CONCENTRADOR
ACRILAMIDA 30%	7,5 ml	15 ml	20.1 ml	2.5 ml
BIS- ACRILAMIDA 1%	5,824 ml	2.58 ml	1.99 ml	2 ml
H₂O	9 ml	4.74 ml	0.36 ml	8.625 ml
TRIS-HCl 1M pH 8.8	7,5 ml	7.5 ml	7.5 ml	-
TRIS-HCl 1.5M pH 6.8	-	-	-	1.875 ml
Persulfato amónico 10%	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Se utilizaron cantidades de proteína comprendidas entre 25-40 µg, en el caso de geles pequeños (6x8,5 cm), y 60-80 µg en el caso de geles grandes (12x14 cm). A los extractos se les añadía tampón de carga Laemmli 4X que contenía:

Tampón de Laemmli 4x	
Tris HCl (pH 7,6)	72 mM
Glicerol	10% v/v
SDS	1 % p/v
Azul de bromofenol	0,002 % p/v
β-Mercaptoetanol	2 mM

La electroforesis se realizaba en sistemas miniprotean a 120 V durante 2 h o en cubetas grandes durante aproximadamente 6 h a un amperaje constante de 35 mA utilizando el siguiente tampón de electroforesis:

Tampón de electroforesis Anderson	
Tris	50 mM
Glicina	400 mM
SDS	0,1 % p/v

Los geles se transferían a membranas de nitrocelulosa por el método semi-seco con un tampón de transferencia formado por:

Tampón de transferencia semiseco	
Metanol	20 % v/v
Tris	50 mM
Glicina	400 mM
SDS	0,1 % p/v

La membrana de nitrocelulosa, previamente sumergida en agua, seguida de tampón de transferencia, se ponía sobre tres trozos de papel Whatman, del mismo tamaño que el gel, empapados con tampón de transferencia. Sobre la membrana, se colocaba el gel, y sobre éste, otros tres trozos de papel Whatman también mojados con tampón de transferencia. La transferencia se llevaba a cabo durante 30-45min, dependiendo del tamaño del gel y del tamaño de las proteínas de interés, con un voltaje constante de 15V. Tras la transferencia, la membrana se teñía con rojo Ponceau para comprobar que la transferencia había sido correcta. A continuación, se realizaba el bloqueo de la membrana con leche o albúmina al 5% en TTBS (Tris-salino):

Tampón tris-Salino	
Tris	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05% v/v

Posteriormente, se incubaba con el anticuerpo correspondiente, bien durante toda la noche a 4° C en el caso de los anticuerpos frente a proteínas fosforiladas, o durante 1 h a temperatura ambiente. En nuestro caso se han utilizado los siguientes anticuerpos:

ANTICUERPO	LABORATORIO	DILUCIÓN
Pan-Fosfo-Tirosina-Clon 4G10	Upstate 05-821	1:1000
Akt	Cell Signaling #9272	1:1000
Bcl-X _L	Cell Signaling #2764	1:1000
BNIP-3	Santa Cruz sc-56167	1:500
C3G (C-14)	Santa Cruz sc-869	1:1000
C3G (H-300)	Santa Cruz sc-15359	1:1000
Catalasa	Sigma C-0974	1:1000
Caveolina-1	BD 610060	1:2000
Cleaved Caspasa 3	Cell signaling #9661	1:1000
GFP	Invitrogen A11122	1:500
ERKs	Cell Signaling #9102	1:1000
Fosfo-Thr202-Tyr204-ERK1/2	Cell Signaling #9101S	1:1000
Fosfo-Thr222-MK2	Cell signaling #3044	1:1000
Fosfo-MKK3/6	Cell signaling #9231	1:1000
Fosfo-p38MAPK	Cell Signaling #9211S	1:500
Fosfo-Thr389-p70S6K	Cell Signaling #4376	1:1000
Fosfo-Ser473-Akt	Cell Signaling #9271	1:1000
Fosfo-sustratos-Akt	Cell signaling #9614	1:1000
Fosfo-Thr308-Akt	Affinity Bioreagents OPA103060	1:1000
Fosfo-Ser79-ACC	Cell signalling #3661	1:1000
Fosfo-Y (4G10)	Upstate Biotech 05-321	1:1000
Fosfo-Ser939-TSC-2	Cell signalling #3615	1:1000
GFP	Molecular Probes A11122	1:1000
p38 α	Santa Cruz sc-535	1:500
p70	Cell signaling #9202	1:1000
Rac-1	Upstate 05-389	1:2000
Rap-1	Santa Cruz sc-0065	1:500
SOD-2	Upstate Biotech 06-984	1:1000
TSC-1	Cell Signaling #4906	1:1000
Tubulina	Sigma T-5168	1:2000
β -actina	Sigma 4-5441	1:5000

Tras la incubación con el anticuerpo, se llevaban a cabo cuatro lavados de 5 min con TTBS. A continuación, se incubaba la membrana a temperatura ambiente durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente, frente a inmunoglobulinas de ratón o conejo, conjugado con la peroxidasa de rábano (Amersham, NA931V; NA934V). Posteriormente, se realizaban cuatro lavados con TTBS, tras lo cual, se realizaba una incubación de 1 min con el

reactivo ECL plus reagent (Amersham, RPN2106), que contiene un sustrato de la peroxidasa quimiluminiscente que impresiona una película fotográfica.

7. BORRADO DE MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

Para re-utilizar las membranas previamente incubadas con uno o varios anticuerpos, en ocasiones, era necesario su borrado antes de incubar con un nuevo anticuerpo. Para ello, se mantenía la membrana a 50° C durante 15-30 min con agitación en la siguiente solución:

Solución de borrado	
Tris HCl pH 6,8	62,5 mM
SDS	0,5 % p/v
β-mercaptoetanol	100 mM

Posteriormente, se lavaba la membrana varias veces con TTBS y antes de volver a incubarla con otro anticuerpo se comprobaba la presencia de proteínas mediante tinción con Rojo Ponceau.

8. INMUNOPRECIPITACIÓN

Esta técnica tiene como finalidad la separación de una proteína específica por precipitación, mediante la utilización de un anticuerpo, a partir de un extracto de proteínas totales. Para realizar este ensayo se utilizaban extractos de proteína total (500-1000 µg). A cada muestra se le añadía 1-3 µg del anticuerpo correspondiente y se incubaba a 4° C durante 2-3h. Transcurrido ese tiempo, se adicionaban 20µl de proteína A o inmunoglobulinas anti-ratón unidas a agarosa (Roche, Ref.:11134515001; Sigma A6531), según el anticuerpo primario usado, previamente lavadas con tampón de lisis (suspensión 50%) y se incubaba durante 45 min a 4°C en rotación para que las esferas de agarosa adsorbiesen los inmunocomplejos. Posteriormente, se centrifugaban las muestras a 13.000 rpm durante 20 s, eliminando el sobrenadante. Se usaba un control negativo, en el cual se añadía sólo proteína A o inmunoglobulina G-agarosa para determinar posibles uniones inespecíficas a las mismas. El precipitado se lavaba con tampón de lisis dos veces y los inmunoprecipitados adsorbidos en las esferas eran posteriormente analizados mediante Western-Blot, tras la adición de tampón de carga.

Para inmunoprecipitar la caveolina-1 se utilizó el anticuerpo de BD(#610060).

9. ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD DE PROTEÍNAS

9.1 Determinación de la actividad de Rap-1

Esta técnica se basa en la capacidad que presenta la proteína Ral-GDS de interaccionar con Rap-1-GTP (forma activa) a través del dominio RBD.

Se utiliza una proteína de fusión constituida por el dominio RBD de RalGDS unido a glutathion-S-transferasa (GST), que se une a glutatión asociado a bolitas de sefarosa formando un complejo Ral-GDS-RBD-GST-GSH-Sefarosa. Con este complejo se incubaban los extractos celulares totales a 4°C con rotación, aislándose la proteína Rap-1-GTP unida mediante centrifugación.

Primero, para evitar interacciones inespecíficas con GST-sefarosa, se hacía un tratamiento previo del extracto proteico (500 µg proteína) resuspendido en tampón MLB (400 µl) con 20µl glutatión-sefarosa (previamente lavadas con MLB) y se dejaba rotando durante 10 min. Se centrifugaba a 13.000 rpm durante 1 min y se recogía el sobrenadante en un tubo nuevo. Se añadían 20 µl de bolitas unidas a Ral-GDS-RBD y se dejaban las muestras rotando durante 30 min a 4° C, lavándose posteriormente con tampón MLB. El precipitado final se resuspendía en 20 µl de tampón de carga 4X y se realizaba un Western-blot utilizando un gel Anderson al 12% y un anticuerpo anti-Rap-1 (1 µg/ml, Santa Cruz). Paralelamente, se realizaba un Western-blot del extracto total para determinar la cantidad total de Rap-1 y poder normalizar los valores de Rap-1 activo.

Tampón MLB	
HEPES, pH 7.5	20 mM
NaCl	150 mM
NP40	1%
MgCl	10 mM
EDTA	1 mM
glicerol	2%
Na ₃ VO ₄	1 mM
NaF	25 mM
PMSF	1 mM
leupeptina	10 µg/ml
aprotinina	10 µg/ml

La proteína de fusión Ral-GDS-RBD-GST se obtenía mediante purificación a partir de bacterias que expresaban una construcción plasmídica realizada en el vector pGEX, que contenía la secuencia que codifica para el dominio RBD de la proteína Ral-GDS. Dicha construcción se había introducido en las bacterias ultracompetentes mediante transformación de células supercompetentes (Epicurean Coli® Ultracompetent Cells de los laboratorios Stratagene). Posteriormente, las bacterias (10% del cultivo) eran crecidas en un medio LB con ampicilina (100 µg/ml) durante 30min-2h, hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm comprendida entre 0.4 y 0.6 (fase exponencial de crecimiento). En ese momento, se añade isopropil-β-D-tio-galactósido (IPTG) (concentración final de 0.2 mM) para inducir la expresión de la proteína de fusión RBD de Ral-GDS-GST. Se deja en agitación durante 2 horas a 37° C. Posteriormente, las bacterias son centrifugadas a 6000 rpm. durante 20 min en un rotor GS3. El sedimento obtenido se resuspendía en 10 ml de tampón de lisado PBST por cada litro de cultivo. Se sonicaba cada muestra 4 ó 5 veces, 20 s. cada vez, dejándolo en hielo 1min entre una y otra vez.

Tampón de lisado bacteriano PBST	
EDTA	2mM
β-Mercaptoetanol	0,1 % v/v
PMSF	0,2 mM
En PBS	

A continuación, se centrifugaba ese lisado a 15.000 rpm. durante 30 segundos en tubos eppendorf de 2 ml a 4° C. Se recogía el sobrenadante y se hacía una reextracción del sedimento añadiendo de nuevo 10 ml de PBST por litro de cultivo, sonicando 2 ó 3 veces más y haciendo una segunda centrifugación. A continuación, se añadían 2 ml de bolitas de glutatión-sefarosa (Amersham, 17-0756-01) por cada 10 ml de lisado, que previamente habían sido lavadas 4 veces con PBS con PMSF. Se dejaba rotando 2 h a 4° C y se lavaba otras 4 veces con PBS con PMSF y se guardaba la proteína purificada unida a GST-sefarosa a 4° C con 0.01% de azida sódica, previa comprobación en un gel de su pureza.

9.2 Medida de la actividad de Rac-1

El fundamento de esta técnica se basa en la capacidad que presenta la proteína PAK interaccionar con Rac, cuando ésta se encuentra unida a GTP (forma activa). Para ello, se utiliza una proteína de fusión constituida por ese dominio de PAK unido a glutatión-S-transferasa (GST), que se va a unir a glutatión asociado a bolitas de sefarosa. De este modo, se puede aislar a la proteína Rac unida a GTP, en forma de complejos Rac-GTP-PAK-GST-GSH-sefarosa por centrifugación.

Primero, para evitar interacciones inespecíficas con GST-agarosa, se hacía un tratamiento previo del extracto proteico (500 µg proteína) resuspendido en tampón MLB (400 µl) con 20µl glutatión-sefarosa (previamente lavadas con MLB) y se dejaba rotando durante 10 min. Se centrifugaba a 13.000 rpm durante 1 min y se recogía el sobrenadante en un tubo nuevo. Se añadían 20 µl de bolitas unidas a PAK-GST-RBD y se dejaban las muestras rotando durante 30 min a 4° C y posteriormente, se lavaban con tampón MLB. El precipitado final se resuspendía en 20 µl de tampón de carga 4X y se realizaba un Western-blot utilizando un gel Anderson al 12% y un anticuerpo anti-Rac (1 µg/ml, de BD). Paralelamente, se realizaba un Western-blot del extracto para determinar la cantidad total de Rac-1 y poder normalizar los valores de Rac-1 activo.

La proteína de fusión PAK-GST se obtenía mediante purificación a partir de bacterias que expresaban una construcción plasmídica realizada en el vector pGEX, que contenía la secuencia que codifica para el fragmento de la proteína PAK que interacciona con Rac-GTP. Dicha construcción se había introducido en las bacterias ultracompetentes mediante transformación de células ultracompetentes. Obteniéndose la proteína de fusión tal y como se ha descrito en el caso de la proteína de fusión RBD de Ral-GDS-GST utilizada para la determinación de Rap-1-GTP en el apartado anterior (9.1).

9.3 Medida de la actividad MK-2

Este estudio se realizó para determinar la actividad de MK-2 (fosforilación de Hsp-27 tras un ensayo quinasas) como control de la actividad de p38α/β (Valladares et al. 2001).

Primero se realizaba una inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo anti-MAPKAPK-2(MK-2) de Stress Biotechnologies Corp (KAP-MA015E). Para realizar el ensayo se partía de un extracto de proteínas totales con una cantidad entre 500-700 µg de proteína total. A este alícuota se le añadía 1 µg de anticuerpo. Se incubaba durante dos horas a 4°C, agitando de vez en cuando para una correcta interacción entre anticuerpo y sustrato. A continuación, se añadían 40µl de Proteína A (50% p/v), y se dejaban a 4°C en rotación durante 45 minutos. Después se realizaban dos lavados con el tampón de lisis y dos lavados con el tampón quinasa (véase protocolo de obtención de extractos celulares totales y de inmunoprecipitación). En cada lavado, se añadían 800µl de cada solución de lavado y se resuspendían las esferas, dando a continuación un golpe de centrifuga para volver a precipitarlas y eliminando el líquido por aspiración.

Tampón quinasa 2x	
HEPES	25 mM
MgCl ₂	25 mM
β-glicerofosfato	25 mM
Ortovanadato sodico	10µM
DTT	2 mM
En H ₂ O	

Una vez adsorbidos los inmunocomplejos a las esferas de agarosa, tras su lavado y purificación, las muestras eran incubadas a 30°C durante 30 min en 30µl del tampón de reacción (tampón quinasa más sustrato), utilizando Hsp27 (StressGen Biotechnologies SPP-715) como sustrato.

Sustrato	
ATP	100µM
(γ- ³² P)ATP	10 mCi
Hsp27	2µg
Quinasa buffer 2x	15µl
En 30µl de H ₂ O	

Para parar la reacción, se añadía tampón de carga Laemmli 4x, y las muestras se calentaban a 95-100°C durante 5 min. La fosforilación del sustrato Hsp27 se visualizaba en autorradiografía, tras la electroforesis de las muestras en geles de SDS-poliacrilamida al 12%.

10. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y/O CONFOCAL DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS

Esta técnica era utilizada para conocer la localización subcelular de las proteínas Rac-1 y caveolina-1, así como su posible colocalización. También nos permitió estudiar la distribución y estructura de los filamentos de actina, así como la formación de fibras de estrés en algunas de las condiciones estudiadas.

En primer lugar, las células eran sembradas sobre cristales circulares depositados dentro de las placas de cultivo. Una vez finalizados los tratamientos correspondientes, las células se fijaban durante 15 minutos a temperatura ambiente con la siguiente solución:

Solución fijadora	
PFA	3,5%
pH 7,4	
En PBS	

A continuación, los platos se lavaban dos veces con PBS. La permeabilización posterior se llevaba a cabo con metanol absoluto a -20°C mediante incubación de 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se realizaban dos lavados con PBS. Sin embargo, para el análisis de las fibras de actina, las células se mantuvieron en la solución fijadora durante una hora para aumentar la permeabilidad de la membrana sin realizar permeabilización con metanol, debido a su efecto desestabilizador sobre los filamentos de actina.

Tras la fijación y permeabilización de las células, se añadía a cada cristal 50 μl de anticuerpo primario o faloidina, diluidos 1:100 en PBS-BSA 0.1% según se indica a continuación:

- Rac-1 (Upstate 05-389)
- Caveolina-1 (BD#610060)
- Phalloidin-TRITC (Sigma P1951)

Para evitar la evaporación de anticuerpo, el cristal con las células se colocaba sobre un trozo de papel de parafina, en donde estaba el anticuerpo. Posteriormente, se realizaban dos lavados con PBS atemperado, tras lo cual las células se incubaban 1 h con 50 µl del anticuerpo secundario correspondiente marcado con una sonda fluorescente: anti-ratón-FITC, anti-ratón-green Oregon o anti-conejo-FITC diluido 1:100 en PBS-BSA 0.1%. Junto con el anticuerpo secundario, se añadía 1µl/ml de DAPI para visualizar los núcleos.

Finalmente, los cristales se montaban en portaobjetos sobre una gota de 1.5 µl de una mezcla 1:1 de PBS-glicerol, de modo que se evitara la formación de burbujas de aire entre el cristal y el portaobjetos. De esta manera, las preparaciones eran analizadas en el microscopio confocal.

11. MEDIDA DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Para medir los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) se usó la sonda Diacetato de 2,7 di-clorofluoresceína (DCFH, Sigma D6665). El DCFH es una molécula neutra no fluorescente que entra por difusión en las células. Una vez en el citoplasma, el DCFH pierde sus grupos acetilo debido a la hidrólisis de esterasas no específicas, generándose diclorofluoresceína. La diclorofluoresceína es susceptible de ser oxidada por las ROS presentes en el interior de la célula, generándose la forma oxidada fluorescente.

Las células se incubaron 1 hora a 37° C con DCFH 1µM en PBS. Después se trataron con H₂O₂ durante diferentes tiempos o se dejaron sin tratar. Transcurrido el tiempo de tratamiento se lavaron con PBS y se despegaron incubando las células con PBS/EDTA. A continuación, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se lavaron con PBS. Por último, se resuspendieron en PBS y se analizó la fluorescencia del DCFH por citometría de flujo. En algunos casos, se tomaron fotografías en microscopio de fluorescencia de las células, no siendo necesario para este protocolo despegar las células del plato.

12. TÉCNICAS PARA DETECTAR MUERTE CELULAR Y/O APOPTOSIS

12.1. Medida de la viabilidad celular por cristal violeta

Este método consiste en la cuantificación de las células que sobreviven a un proceso de toxicidad o muerte celular y se mantienen adheridas a la placa de cultivo, tiñéndose con el colorante cristal violeta. Para teñirlas se usa una solución de Cristal violeta al 0.2% p/v (SIGMA C-0775) en etanol al 2% (300 µl por pocillo de placa multipocillo de 12).

Solución de cristal violeta	
Etanol	2 % v/v
Cristal violeta	0,2 % p/v
En agua	

Para realizar estos ensayos, se debe cuantificar el número de células utilizando la cámara de Neubauer, de forma que se siembre el mismo número de células para todas las condiciones a estudiar. Una vez realizados los correspondientes tratamientos, las células se lavaban 2 veces con PBS atemperado y se añadía la solución de cristal violeta, incubándose durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaban las placas con agua destilada hasta eliminar cualquier resto de cristal violeta y se dejaban secar los platos. Finalmente, se resuspendían las células en SDS al 1% y se medía la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm.

12.2. Análisis del contenido en DNA por citometría de flujo

Este método está basado en la tinción del DNA con yoduro de propidio. El yoduro de propidio se intercala entre las bases de DNA, emitiendo fluorescencia, de tal modo que la intensidad de la misma es proporcional a la cantidad de DNA de la célula. Dicha fluorescencia se cuantifica por citometría de flujo. Este método permite analizar el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. El porcentaje de células apoptóticas corresponde al pico hipodiploide, puesto que en estas se fragmenta el DNA y el contenido en DNA es inferior a 2C.

Para analizar la apoptosis, se recogía el medio de cultivo para no perder las células muertas que se hubieran despegado de la placa. Las células se lavaban dos veces con PBS y se tripsinizaban con una solución 0,25% tripsina-0,02% EDTA, añadiendo medio de cultivo suplementado con un 10% de suero fetal para parar la acción de la tripsina. De esta forma, se obtenía una suspensión de células que se centrifugaba a 2.000 rpm. durante 5 min a 4° C. El sedimento celular se lavaba con PBS dos veces y las células eran fijadas y permeabilizadas con etanol (700 µl a -20° C) que se añadía tras resuspender las células en 300 µl de PBS frío (concentración final de 70% etanol) manteniéndose a 4°C durante 1 min. Posteriormente, las células se centrifugaban a 2.000 rpm. durante 5 min a 4° C, se lavaban con PBS y se resuspendían en 500µl de PBS. Para eliminar el RNA, que también se une al yoduro de propidio, se hacía un tratamiento de 30 min a 37°C con RNAsa A (Roche, #109169) a una concentración final de 100 µg/ml (25µg/10⁶células). Finalmente, se añadía el yoduro de propidio (Sigma, P-4170) a una concentración final de 0,05 mg/ml. Las muestras se mantenían a 4°C y protegidas de la luz hasta el momento de analizarlas en el citómetro de flujo.

12.3. Medida de la condensación y/o fragmentación de los núcleos mediante microscopía de fluorescencia tras tinción con yoduro de propidio

Este método se basa en la identificación de núcleos apoptóticos mediante microscopía de fluorescencia tras la fijación y posterior tinción con yoduro de propidio. Esta técnica nos permite diferenciar si las células están sufriendo un proceso de apoptosis o de necrosis. El yoduro de propidio se intercala entre las bases del DNA, emitiendo fluorescencia y permitiendo la identificación de la morfología típica de condensación y/o fragmentación nuclear que se produce en las células que han iniciado los procesos apoptóticos.

Para realizar este análisis, las células eran lavadas con PBS 2 veces y se fijaban mediante incubación en una solución fijadora (3Metanol:1Acético conservada a - 20° C) durante 30 min. a temperatura ambiente. Tras esta incubación se lavaba 3 veces con PBS para eliminar el exceso de solución fijadora y se teñían las células con la solución de tinción y se trataba con RNAsa a 37° C en oscuridad para eliminar el RNA.

Solución de tinción	
TritónX-100	0,1 % v/v
EDTA	0,1 M
RNAsa	5 µg/ml
Yoduro de propidio	5 µg/ml
En PBS	

Tras la tinción se lavaba con PBS para eliminar el exceso de solución de tinción y se realizaba el montaje para visualizar los núcleos en el microscopio de fluorescencia y contar aquellos que estaban condensados y/o fragmentados.

13. ENSAYOS DE ADHESIÓN CELULAR

Este ensayo nos permite determinar la capacidad que tienen las células de unirse a un sustrato determinado. En nuestro caso, se añadía 1 ml de DMEM-10% FBS a cada uno de los pocillos de placas multipocillo. Sobre este medio, se sembraban 2×10^4 células y se dejaban a 37°C durante 30min. Transcurrido ese tiempo, se eliminaba el medio de cultivo y se cuantificaba el número de células que se habían adherido a la matriz mediante tinción de las mismas con cristal violeta.

14. AISLAMIENTO DEL DNA TOTAL DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO Y GENOTIPAJE DE LAS CÉLULAS DEFICIENTES EN C3G

Para el genotipaje de líneas celulares, MEFs C3G^{-/-}, se aisló el DNA. Para ello, primero se eliminaba el medio de cultivo, se lavaban las células con PBS y se recogían utilizando un rascador, transfiriéndose a un tubo. Se centrifugaban a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. Se lavaba el pellet con PBS y se centrifugaba nuevamente para eliminar el exceso de PBS. Tras los lavados, se resuspendía el pellet en el tampón de lisis para aislar DNA y se incubaba en este tampón a 55° C durante 2 horas.

Tampón de lisis para aislar DNA	
Tris pH 8,5	100 mM
EDTA	5 mM
SDS	0,2 % p/v
NaCl	200 mM
Proteinasa K	100 µg/ml

Una vez finalizada la digestión de proteínas con la proteinasa K, se procedía a la desproteinización. Se añadían a la muestra 500 µl de fenol, invirtiendo varias veces el tubo hasta una perfecta homogenización. Se centrifugaba durante 10 minutos a 12000 rpm para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Se recogía la fase acuosa que contenía los ácidos nucleicos y se mezclaba con cloroformo (igual volumen de sobrenadante recogido) invirtiéndolo de nuevo hasta conseguir una perfecta homogenización. Se centrifugaba 10 minutos a 12000 rpm y se recogía el sobrenadante acuoso con los ácidos nucleicos. Se le añadía 1:10 volúmenes de acetato sódico 3M a pH 5,2 y un volumen de isopropanol. Se mezclaba hasta que precipitaba el DNA y se transfería el DNA a un tubo nuevo con etanol al 70% para lavar los posibles restos de isopropanol. Se centrifugaba durante 5 minutos a 7500 rpm y se retiraba el etanol. Por último, se resuspendía el pellet en agua ultrapura estéril y se guardaba a -20 °C hasta su posterior utilización.

Para valorar la concentración y pureza del DNA, se realizaba una lectura espectrofotométrica a 260, 280 y 310 nm. A 260 para calcular la concentración DNA en la muestra (1 unidad de D.O. corresponde a una concentración de 50 µg/ml de DNA de doble cadena); a 280 nm para detectar las proteínas o restos de fenol, y a 310 nm para otras impurezas. A_{260}/A_{280} refleja grado de pureza de las muestras, debiendo ser esta relación de 1.5-2.

Una vez obtenido el DNA se analizó la presencia o ausencia de los genes mediante PCR, utilizando los siguientes oligonucleótidos:

1-Para C3G de ratón exón 15 (n1757-n1777):

forward: 5'-AAGGAATGGCTGCAGATGGTCAAGC-3'

reverse: 5'-GGGACTCACTCTACAAGGAACTCCA-3'

2-Para C3G humano (n1896-n1919):

forward: 5'-CCGGATCCTCATGGGGTATACGGCTTCA-3'

reverse: 5'-CGGAATTCCCAGGGACGCCGCTGACCGCT-3'.

3- GAPDH de ratón:

forward: 5'-CATCAAGAAGGTGGTGAAGC-3'

reverse: 5'-CATCGAAGGTGGAAGAGTTGG-3'.

15. AISLAMIENTO DEL RNA TOTAL DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO

Para el aislamiento del RNA total de las células se utilizó una solución comercial de fenol/cloroformo Trizol. Tras incubar las células en presencia de los distintos estímulos, el medio de cultivo era aspirado, añadiéndose 1ml de Trizol por plato de 6 cm para lisar las células mediante pipeteo. Tras la agitación de las muestras durante 1 min, se incubaban 15 min. en hielo. A continuación, se centrifugaban los tubos a 12000 rpm. durante 15 min. La fase acuosa en la que se encuentra el RNA era recogida, añadiéndosele un volumen de isopropanol para precipitar el RNA. Para ello, las muestras se mantenían a -20°C durante varias horas (1-16h), después se centrifugaban durante 10 min a 12000 rpm a 4°C. El sobrenadante se eliminaba por aspiración y el sedimento se resuspendía en 1ml de etanol al 75% (v/v) para lavar el RNA. Por último, los tubos se centrifugaban durante 10min a 12000 rpm a 4° C. El sobrenadante era retirado por aspiración, mientras que el sedimento se dejaba secar, siendo finalmente resuspendido en 20µl de EDTA 1mM, pH 7.0.

También se utilizó el Kit de extracción de RNA mediante columnas de Quiagen (Quiagen; Cat nº 74104) para algunos tipos de análisis ("microarrays" de DNA o PCR cuantitativa, por Ej.) siguiendo las instrucciones del fabricante, incluida la digestión con DNasa (Quiagen 79254).

Para valorar la concentración y pureza del RNA, se realizaba una lectura espectrofotométrica a 260, 280 y 310 nm. A 260 para calcular la concentración RNA en la muestra (1 unidad de D.O. corresponde a una concentración de 40 µg/ml); a 280 nm para detectar restos de proteínas o de fenol y a 310 nm para otras impurezas. A_{260}/A_{280} refleja el grado de pureza de las muestras, debiendo ser esta relación de 1.5-2.

15.2 RT-PCR semicuantitativa

Tras el aislamiento del RNA total con el reactivo Trizol o con el kit de extracción de RNA mediante columnas de Quiagen, se usaron entre 1 y 3µg de ese RNA para cada reacción de síntesis del cDNA por transcripción inversa utilizando el Kit SuperScrip III RT (Quiagen 18080-044). Posteriormente, se hicieron las PCRs correspondientes utilizando los siguientes oligonucleótidos:

1-Para C3G de ratón exón 15 (n1757-n1777):

forward: 5'-AAGGAATGGCTGCAGATGGTCAAGC-3'

reverse: 5'-GGGACTCACTCTACAAGGAACTCCA-3'

2- Para SOD-1 de humano

forward. 5'-GATGAAGAGAGGCATGTTGG-3'

reverse: 5'-CCAATGATGCAATGGTCTCC-3'

3- GAPDH de ratón:

forward: 5'-CATCAAGAAGGTGGTGAAGC-3'

reverse: 5'-CATCGAAGGTGGAAGAGTTGG-3'.

16. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL UTILIZANDO ARRAYS DE DNA

Para ello, se han utilizado “Genechip®” comerciales de Affymetrix MOE430A para ratón. Contiene sondas de 25 nucleótidos diseñadas a partir de secuencias de ratón obtenidas de GenBankTM, dbEST y RefSeq. Estas sondas codifican para aproximadamente 14.000 genes de ratón. Se ha utilizado RNA total, realizándose una hibridación individual para cada muestra en la unidad de “arrays” del Centro del Cáncer de Salamanca (CIC). Una vez escaneados los arrays, se obtuvieron las intensidades para cada una de las sondas, y posteriormente, se realizó un análisis estadístico de los resultados en el Servicio de Informática del mismo Centro (GeneChip Scanner 3000 7G, GeneChip Operating Software (GCOS) v1.1.1).

Tras el análisis estadístico se seleccionaron los genes que presentaban un V-value (Log normalizado de la intensidad de cada sonda) superior a 1 o inferior a -1. Estas sondas se compararon con la base de datos Biomart de Ensembl Genome Browser <http://www.ensembl.org/biomart/martview>; para obtener el nombre y descripción del gen.

17. OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO PARA TRANSFECCIÓN

17.1. Transformación de bacterias competentes

Para realizar la transformación se usaban bacterias *Escherichia coli* competentes (Epicurean Coli® Ultracompetent Cells) de la casa comercial Stratagene. Tras descongelar en hielo 50 µl de bacterias, se les añadía 0,85 µl de β-mercaptoetanol y se dejaban en hielo 10 min, agitando periódicamente a intervalos de 2 min. Posteriormente, se añadían 50-100 ng del plásmido de interés (construcciones en pRS, pcDNA3 u otras) y se dejaba en hielo 30 min. A continuación, se pasaban los tubos a 42° C durante 90 s y luego a hielo 2 min. Se añadía a cada tubo 800 µl de medio LB (10 g Bacto-triptona, 10 g NaCl y 5 g de extracto de levadura por litro, pH 7, esterilizado en autoclave) y se incubaban a 37° C durante 45 min. Una vez hecha la transformación, se procedía a la selección de las bacterias que habían incorporado el plásmido mediante la siembra en placas petri con LB-Agar (medio LB al 1,5% de agar) suplementado con el antibiótico correspondiente en función del gen de resistencia que contenía el plásmido (ampicilina 100 µg/ml). Las bacterias se dejaban crecer durante toda la noche a 37°C. Todo el proceso de transformación se realizaba al mechero Bunsen para evitar contaminaciones.

17.2. Crecimiento bacteriano, extracción y purificación del DNA plasmídico

Para la obtención de los DNAs plasmídicos a partir de los glicerolizados o de las colonias de cepas bacterianas, se procedía al crecimiento de dichas bacterias en medio LB en suspensión. En primer lugar, se realizaba un preinóculo en tubos Falcon 2059 estériles que contenían 10 ml del medio LB suplementado con el antibiótico adecuado (ampicilina 100 µg/ml), manteniéndose toda la noche a 37°C con agitación orbital. A la mañana

siguiente, se pasaba el contenido de cada tubo a un matraz con 500 ml de medio LB suplementado con el antibiótico y se dejaba crecer durante 10-24h.

Las bacterias se centrifugaban entonces a 6.000 x g durante 10 min a 4° C en una centrífuga Sorvall (rotor GSA), y el precipitado de bacterias se sometía a una lisis alcalina para extraer el DNA plasmídico, siguiendo el protocolo indicado en el kit “QIAGEN Plasmid Kits”. Para ello, las bacterias se resuspendían en 10 ml de un tampón con 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA y 100µg/ml RNasa A. Posteriormente, se añadían 10 ml de tampón de lisis (200 mM NaOH, 1% SDS) y se mezclaba por inversión, incubándose 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaban 10 ml del tampón de neutralización (3 M acetato potásico pH 5.5) y se dejaba la mezcla 20 min en hielo. El siguiente paso consistía en una centrifugación a 12000 rpm. durante 30 min., desechando el sobrenadante. Paralelamente, las columnas de Quiagen tip-500 se equilibraban con 10ml del tampón: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% etanol y 0.15% Tritón X-100. Sobre estas columnas, se depositaba la muestra y se dejaba pasar. Se lavaba la columna con 60 ml de tampón de lavado (1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% etanol) y luego se eluía el DNA añadiendo 5ml de tampón de elución (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 15% etanol). El DNA plasmídico así obtenido se precipitaba con isopropanol y tras centrifugación y lavado con etanol, se resuspendía en tampón TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8) y se conservaba a -20°C.

17.3. Transfección de células eucariotas

17.3.1. Método del fosfato cálcico

Las transfecciones con fosfato cálcico se llevaban a cabo utilizando un Kit de Stratagen (Ref. 200388). Para cada plato de 10 cm de diámetro se prepara una mezcla I que lleva los siguientes componentes:

Solución I		Solución II
DNA	10 µg	HBS 2x (N ₂)
Solución I (CaCl ₂)	25 µg	
H ₂ O hasta 250 µl		

A continuación, se preparaban 250 µl de solución II (HBS 2X), la cuál, se gaseaba con N₂ durante 1min. Se añadía gota a gota, la mezcla I sobre la solución II y se dejaba a temperatura ambiente durante 30 min. Tras la incubación se añadían, repartiendo bien por toda la superficie, los 500 µl de la mezcla anterior sobre cada plato, a los que previamente se les ha puesto 5 ml de DMEM-MBS 5%. Las células se dejaban 4 h en el incubador y se les retiraba el medio, sustituyéndolo por 5 ml de PBS-glicerol 15%, que se mantenía durante 2min. A continuación, se lavaban los platos con PBS y se dejaban 24 h con el medio de cultivo normal. Tras 24-48 h, se realizaba una selección de las células que han incorporado la construcción mediante crecimiento en el medio de selección adecuado para cada construcción.

17.3.2. Método de análogos de Lipofectamina

El día previo se sembraban con el fin de conseguir una confluencia entre el 50-80%. Para platos de 6 cm de diámetro se utilizaba 6 µg de DNA que se diluía en 300 µl de D-MEM sin suero y sin antibióticos. Esta solución se mezclaba con la solución 2 que contenía 24µl de METAFECTENE (Biontex, cat. nº T 020) diluido en 300 µl de D-MEM sin suero y sin antibióticos. La mezcla de las dos soluciones se incubaba durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos DNA/Metafectene. Durante este tiempo se cambiaba el medio de crecimiento a las células por D-MEM al 5% de suero, de manera que el suero no afecte a la formación de los complejos pero no se produzca muerte celular por retirada de suero. Las células se mantenían de 6 a 24 horas en el incubador. Finalizado este tiempo, se añadía el medio de crecimiento normal. Tras 24-48 h, se realizaba una selección de las células que habían incorporado la construcción mediante crecimiento en el medio de selección adecuado para cada construcción.

17.3.3 Construcciones utilizadas

En nuestro caso, se han utilizado diferentes construcciones que requerían medios de selección diferente:

- **Construcciones en el vector pRetro-Super-puro (pRS).** El medio de selección era D-MEM suplementado con 10% de FBS y puromicina (1µg/ml). En este

medio se mantenían 4 semanas. La construcción contenía un shRNA para C3G. Este shRNA contenía 19 nucleótidos específicos correspondientes a la secuencia de C3G (Acc. n°: AF348669), más los nucleótidos localizados justo antes de la secuencia complementaria:

5'GATCCCCGCCCTCTCCTCCTGTTATATTCAAGAGATATAACAGGAG
GAGAGGCTTTTTGGAAA3'.

Se utilizaron las zonas de corte para las enzimas de restricción Bgl II y Hind III para realizar el ligamiento en el plásmido psuper.Retro.puro (pRS), previamente tratado con las enzimas de restricción Bgl II y Hind III de acuerdo a las especificaciones comerciales.

- **Construcciones para re-expresar p38 α** en las células deficientes en dicha proteína. Se realizaron transfecciones transitorias utilizando una construcción que contiene el cDNA humano para p38 α clonado en el vector pEFmlink, utilizando el sitio de corte de EcoR I.

- **Construcción con un dominante negativo de Rac-1 (DNRac-1).** Se utilizó la construcción Rac-1 N17 dominante negativo fusionada a GFP clonada en el plásmido pcDNA3. Se realizó una co-transfección con el plásmido p.Babe.puro (en relación 1/10 vs pcDNA3), dado que los cardiomiocitos presentaban ya resistencia a Geneticina (Adams y Porras 2000). De esta manera, nos asegurábamos que los clones resistentes a puromicina, tuviesen una alta probabilidad de haberse co-transfectado con el plásmido pcDNA. El medio de selección era D-MEM suplementado con 10% de FBS y puromicina (1 μ g/ml). Posteriormente, se realizó una segunda selección utilizando D-MEM suplementado con 10% de FBS y Geneticina (0,2 μ g/ml). En este medio se mantenían 4 semanas.

- **Construcción con un dominante negativo de Rap-1 (DNRap-1).** Se utilizó la construcción Rap-1 dominante negativo (con Ser17 sustituida por Asn) clonada en el plásmido pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), utilizando el sitio de corte de la enzima de restricción de Bam HI. Posteriormente, se realizó la selección de los clones y amplificación para generar clones estables utilizando D-MEM suplementado con 10% de FBS e Higromicina (0,5 μ g/ml). En este medio se mantenían 4 semanas.

Resultados

1. p38 α MAPK REGULA POSITIVA O NEGATIVAMENTE LA ACTIVIDAD DE Rac-1 DEPENDIENDO DE LA PRESENCIA DE SUERO

La familia de GTPasas Rho/Rac constituye un subgrupo numeroso dentro de la superfamilia Ras. Existen más de una docena de miembros de esta familia en mamíferos, los cuales se clasifican en 5 subfamilias, tres de las cuales, Rac, Cdc42 y Rho, están ampliamente caracterizadas tal y como se ha comentado en la introducción. Estas proteínas se encuentran presentes en todos los eucariotas y controlan una amplia variedad de funciones celulares ya que conectan la activación de receptores de membrana con múltiples rutas intracelulares.

En particular, cuando iniciamos este estudio existían datos en la bibliografía que indicaban que Rac-1 podía inducir la activación de p38 MAPK (Xu et al. 2003). Así, por ejemplo, Rac-1 media la activación de p38 MAPK inducida por H-Ras, dando lugar a la migración de células epiteliales de cáncer de mama (Shin et al. 2005). Esto plantea la posibilidad de que Rac-1 y p38 α usen rutas comunes para regular algunas funciones celulares como la proliferación, diferenciación y transformación. Dado que, ambas proteínas presentan funciones solapadas implicadas en la migración o adhesión, cabía la posibilidad de que pudiera existir una regulación entre ambas rutas.

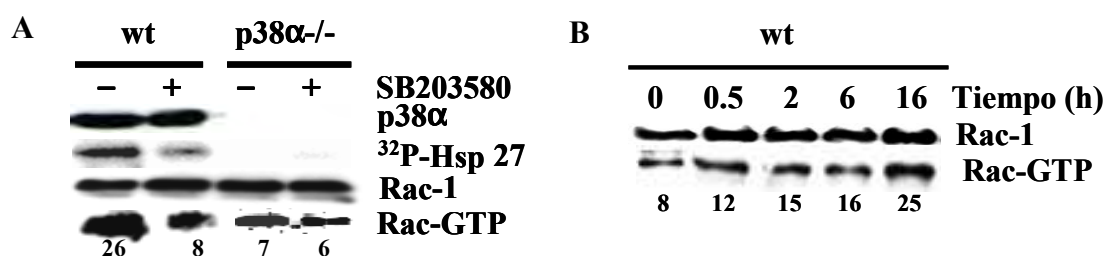
1.1 La activación de Rac-1 en células mantenidas sin suero depende de p38 α y de adhesión:

En nuestro grupo habíamos demostrado que p38 α regulaba positivamente la interacción entre la caveolina-1 y la fosfatasa PP2A (Zuluaga et al. 2007), así que cabía la posibilidad de que p38 α pudiera regular la interacción entre la caveolina-1 y otras proteínas que se asocian a membrana como Rac-1. En base a esto, nos propusimos analizar si la regulación de la actividad de Rac-1, así como su interacción con caveolina-1, podría estar mediada por p38 α . Para ello, utilizamos líneas derivadas de cardiomiocitos procedentes de embriones de ratón de fenotipo silvestre y deficientes en p38 α .

Se analizó la relación existente entre p38 α y Rac-1. Vimos que las células de fenotipo silvestre, mantenidas sin suero durante 16h, presentaban unos niveles de Rac-

1-GTP cuatro veces superiores a los de las células deficientes en p38 α (Fig. 27A). A su vez, el tratamiento de las células de fenotipo salvaje con SB2035680, inhibidor selectivo de p38 α / β , dio lugar a un descenso en los niveles de Rac-1-GTP, alcanzándose unos niveles semejantes a los encontrados en las células deficientes en p38 α (Fig. 27A). Esta mayor activación era dependiente del tiempo y ya era detectable a los 30 minutos, tras la retirada del suero (Fig. 27B).

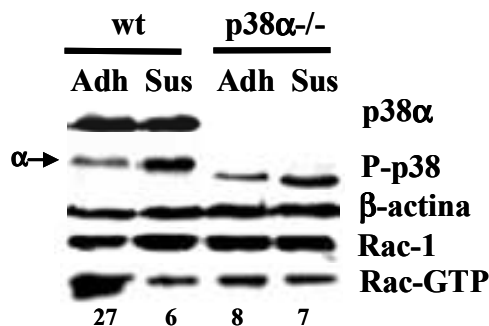
Figura 27: p38 α regula positivamente la actividad de Rac-1 en cardiomiocitos mantenidos en ausencia de suero



Los cardiomiocitos de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α -/-) se mantuvieron sin suero durante 16 h (A) u otros tiempos (B), tratados o no con SB203580 (5 μ M), tal y como se indica. (A) Niveles de Rac-1-GTP. La actividad de MK-2 (fosforilación de Hsp-27 en un ensayo quínasa) también se determinó como control de la actividad de p38 α y su inhibición por SB203580. (B) Niveles de Rac-1-GTP en cardiomiocitos de fenotipo silvestre a diferentes tiempos tras la retirada de suero. Los números corresponden al análisis densitométrico de Rac-1-GTP normalizado frente a los niveles totales de Rac-1 (media de 3 experimentos).

Se ha descrito que la pérdida de adhesión puede afectar a la actividad de Rac-1 debido a la internalización de las caveolas y “lipid rafts”, en dónde está presente la forma activa de Rac-1 (del Pozo et al. 2005). Por ello, decidimos analizar los niveles de Rac-1-GTP en los cardiomiocitos mantenidos en suspensión durante 6 horas. La pérdida de adhesión produjo un descenso en los niveles de Rac-1-GTP en las células de fenotipo silvestre. Sin embargo, no se observó ningún cambio en las células deficientes en p38 α , como cabía esperar, teniendo en cuenta los bajos niveles de Rac-1-GTP que presentaban. Por tanto, este resultado sugería que la adhesión es necesaria para la activación de Rac-1 dependiente de p38 α en células mantenidas sin suero (Fig. 28). Por ello, aunque la pérdida de adhesión produjo un aumento en los niveles de fosforilación de p38 α , se produjo un descenso en los niveles de Rac-1-GTP (Fig. 28). Esto sugiere que sólo cuando Rac-1 está en membrana es regulado por p38 α . Curiosamente, las células deficientes en p38 α presentaban un incremento en los niveles de fosforilación de otra isoforma de p38 de mayor movilidad tras la pérdida de adhesión (Fig. 28).

Figura 28 : La activación de Rac-1 es dependiente de p38 α y de adhesión en cardiomiocitos mantenidos en ausencia de suero

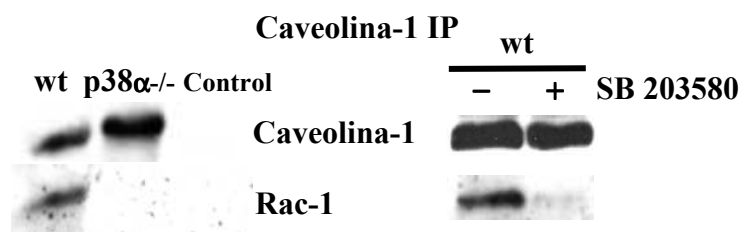


Los cardiomiocitos de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α -/-) fueron mantenidos sin suero durante 16h y posteriormente, durante otras 6h adicionales, bien en suspensión (Sus) o adheridos (Adh) al sustrato. Los datos del análisis densitométrico de los niveles de Rac-1-GTP normalizado frente a los niveles totales de Rac-1 se expresan como valores relativos (media de 3 experimentos). Los niveles de P-p38 fueron determinados como control de la activación de p38 MAPK.

Dado que la forma activa de Rac-1 (Rac-1-GTP), dependiente de la activación de integrinas, se une preferentemente a caveolas y balsas lipídicas (“lipid rafts”) (del Pozo 2004), y que la caveolina-1 está presente en las caveolas, cabía la posibilidad de que Rac-1 y caveolina-1 interaccionaran. Por ello, decidimos analizar dicha posibilidad.

Observamos que Rac-1 co-inmunoprecipitaba con caveolina-1 en los cardiomiocitos de fenotipo silvestre (aproximadamente un 1,5% del total de Rac-1), mientras que en las células deficientes en p38 α o en las células que expresan p38 α tratadas con SB203580 dicha co-inmunoprecipitación era prácticamente indetectable (0,06 % del total de Rac-1) (Fig. 29).

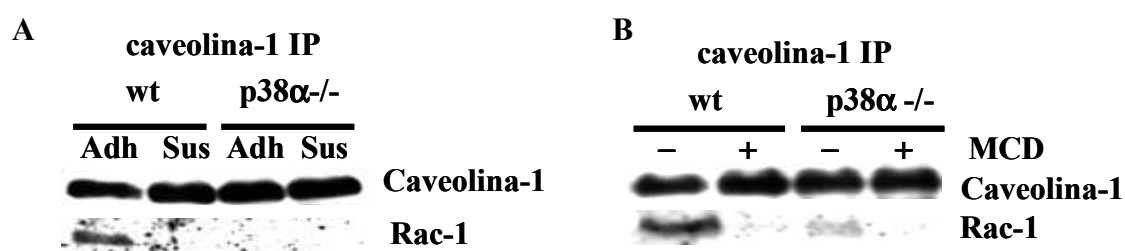
Figura 29: p38 α regula positivamente la interacción entre Rac-1 y caveolina-1



Los cardiomiocitos de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α -/-) fueron mantenidos en ausencia de suero durante 16h. La caveolina-1 fue inmunoprecipitada con un anticuerpo específico a partir de extractos celulares y posteriormente se analizó su presencia, así como la de Rac-1 mediante Western-blot. El control (negativo) se realizó mediante incubación de los extractos celulares de cardiomiocitos que expresaban p38 α con proteína-A-agarosa.

Como habíamos demostrado previamente, la adhesión celular está involucrada en la regulación de la activación de Rac-1, probablemente como resultado de la falta de activación de las integrinas. Por ello, quisimos comprobar si la pérdida de adhesión tenía algún efecto sobre la formación de complejos caveolina-1-Rac-1. En efecto, vimos que la pérdida de adhesión de los cardiomiocitos impidió la formación de dichos complejos, dado que no se detectó Rac-1 en los inmunoprecipitados de caveolina-1 procedentes de cardiomiocitos que expresan p38 α mantenidos sin suero y en suspensión durante 6h (Fig. 30).

Figura 30: Regulación de la formación de complejos Rac-1-caveolina-1 por adhesión y depleción de colesterol en cardiomiocitos mantenidos sin suero



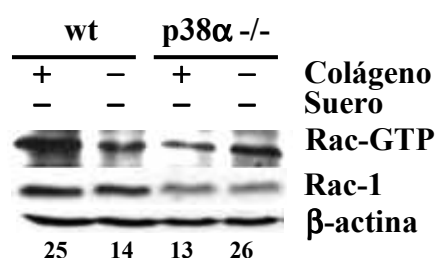
Los cardiomiocitos de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α -/-) se mantuvieron sin suero durante 16h (A, B). Posteriormente, las células se mantuvieron durante otras 6h adicionales sin suero, en suspensión (Sus) o adheridos (Adh) al sustrato (A); o se trataron con β -Metil-ciclodextrina (MCD) 10mM durante 1h (B). Se prepararon inmunoprecipitados de caveolina-1 y se analizaron mediante western blot con los anticuerpos de caveolina-1 y Rac-1.

Se ha demostrado que la pérdida de adhesión produce una internalización del colesterol y de otros componentes lipídicos de los “lipid rafts”, lo que daría lugar a la internalización de las caveolas (del Pozo et al. 2004, del Pozo et al. 2005). De la misma manera, el tratamiento con β -Metil-CicloDextrina (MCD), compuesto que produce la depleción del colesterol, induce la ruptura de las caveolas (y “lipid rafts”) mimetizando la pérdida de adhesión (del Pozo et al. 2004). Por ello, analizamos si el tratamiento con MCD en cardiomiocitos adheridos al sustrato tenía un efecto análogo a la pérdida de adhesión sobre la formación de los complejos entre caveolina-1 y Rac-1. En efecto, la MCD produjo una disminución en los niveles de Rac-1 presente en los inmunoprecipitados de caveolina-1 en las células de fenotipo silvestre, mientras que no tuvo ningún efecto en las células deficientes en p38 α (Fig. 30B).

Estos resultados indican que p38 α regula la actividad de Rac-1 y la interacción de caveolina-1-Rac-1 mediante un mecanismo dependiente de adhesión en

cardiomiocitos mantenidos sin suero, y por lo tanto, dependiente de la activación de integrinas. Por ello, quisimos analizar la influencia de la naturaleza del sustrato sobre esta interacción. Concretamente, estudiamos el efecto del colágeno en la regulación de Rac-1. Observamos que la presencia de colágeno dio lugar a un aumento de la actividad de Rac-1 en las células que expresaban p38 α y una disminución en las células deficientes en dicha quinasa (Fig. 31). Por tanto, dependiendo del tipo de sustrato utilizado (colágeno o plástico), la regulación de la actividad de Rac-1 por p38 α MAPK era diferente, siendo potencialmente dependiente del tipo de integrinas activadas en cada caso.

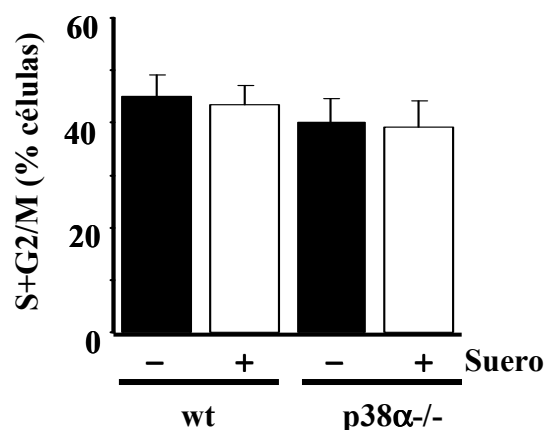
Figura 31: Regulación de los niveles de Rac-1-GTP por el sustrato de adhesión



Los cardiomiocitos de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α -/-) fueron sembrados en placas con o sin colágeno, según se indica y mantenidos en ausencia de suero durante 16h. Se muestran los niveles de Rac-1-GTP normalizados con Rac-1, que fueron cuantificados mediante análisis densitométrico, expresándose como valores relativos (media de 3 experimentos).

1.2 p38 α regula negativamente la actividad de Rac-1 en presencia de suero

Como hemos visto, los niveles de Rac-1-GTP eran mayores en los cardiomiocitos que expresaban p38 α que en los deficientes en dicha quinasa cuando las células eran mantenidas en ausencia de suero. Por ello, quisimos analizar si este efecto positivo se mantenía en células confluentes mantenidas en presencia de un 10% de suero. Previamente, habíamos cuantificado las tasas de proliferación de nuestras células en presencia y ausencia de suero, dado que la proliferación podría afectar a la activación de Rac-1 (Pani et al. 2000). Observamos que no había cambios significativos en la proliferación de las células confluentes mantenidas con o sin suero durante 16h (Fig. 32).

Figura 32: Efecto del suero sobre la proliferación en cardiomiocitos confluentes

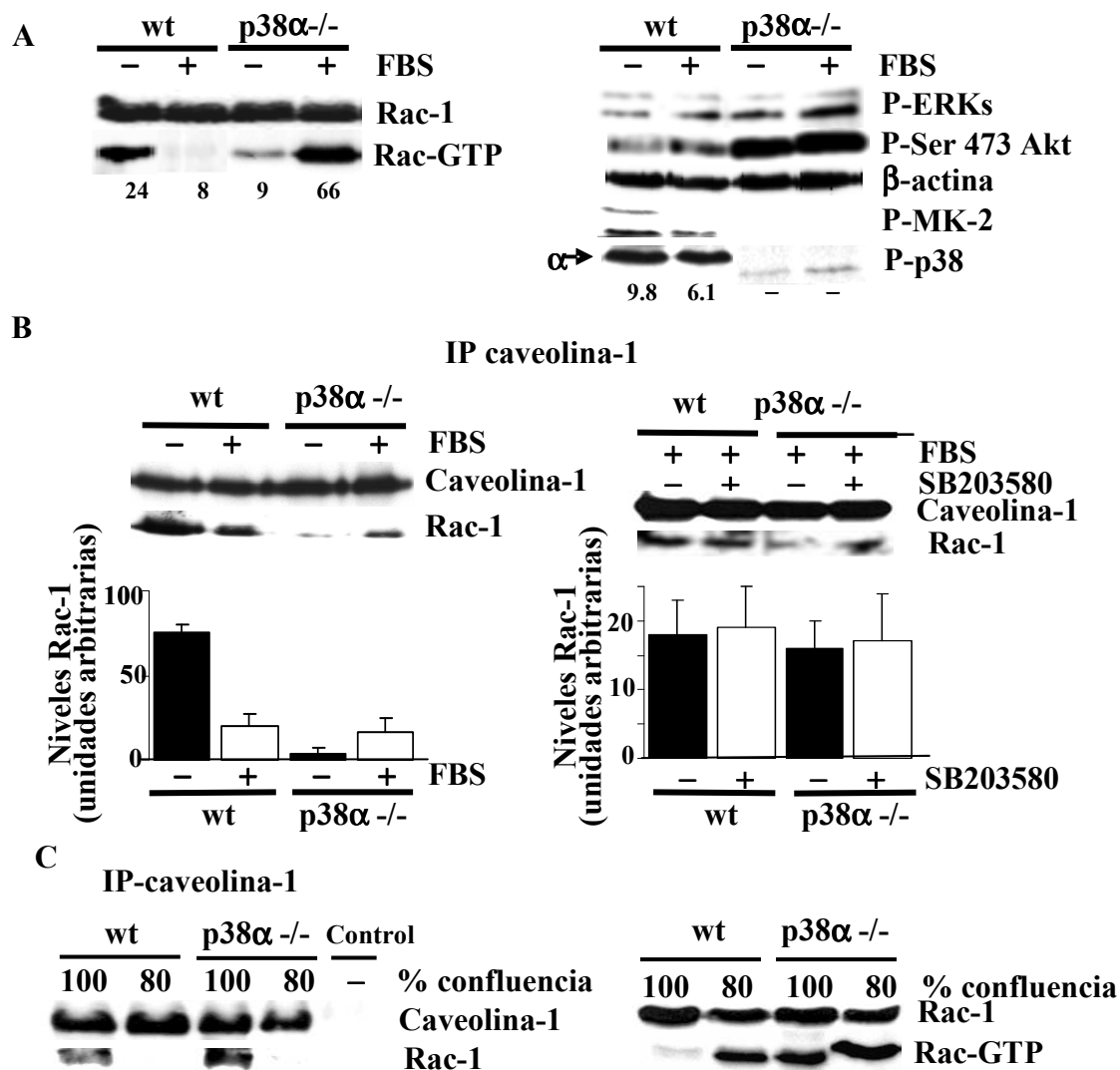
Los cardiomiocitos de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α ^{-/-}) confluentes fueron mantenidos en presencia o ausencia de suero durante 16h, según se indica. Porcentaje de células en las fases proliferativas (S y G2/M) del ciclo celular analizado mediante citometría de flujo.

Sorprendentemente, encontramos que en presencia de suero, las células deficientes en p38 α presentaban mayores niveles de Rac-1-GTP que las células de fenotipo silvestre (Fig. 33A). Este efecto podría ser debido a las numerosas rutas de transducción de señales que son activadas en respuesta al suero, las cuales, se regulan de manera diferencial según esté presente o no p38 α . De hecho, como se puede observar en la figura 33A (panel derecho), en las células mantenidas en presencia de suero, hay mayor activación tanto de la ruta de las ERKs como de la de Akt en ambos tipos celulares. Sin embargo, estas rutas están mucho más activadas en las células deficientes en p38 α . Por otro lado, la activación de p38 α /MK-2 en los cardiomiocitos de fenotipo silvestre es algo menor en presencia de suero (a largo plazo). Por tanto, el diferente balance de señales presentes en ausencia o presencia de suero podría explicar la menor activación de Rac-1 en las células que expresan p38 α mantenidas con suero.

Teniendo en cuenta el diferente papel de p38 α sobre la activación de Rac-1 en presencia de suero, analizamos las interacciones presentes entre caveolina-1 y Rac-1 en estas condiciones. Como se puede ver en la figura 33B, vimos que la interacción entre estas dos proteínas era muy baja tanto en células con p38 α como en las deficientes en dicha quinasa, a diferencia de lo que ocurría en células mantenidas sin suero. De acuerdo con esto, el tratamiento con SB203580 no ejerció ningún efecto significativo. Esto sugiere que, en presencia de suero, la formación de los complejos caveolina-1-Rac-1 no es dependiente de p38 α ni se correlaciona con la activación de Rac-1. Por otro

lado, la confluencia celular sí parece jugar un papel importante en la formación de los complejos caveolina-1-Rac-1, de tal forma que en células subconfluentes la interacción entre Rac-1 y caveolina-1 era indetectable, mientras que los niveles de Rac-1-GTP eran mucho más elevados en ambos tipos celulares (Fig. 33C).

Figura 33: La ausencia de p38 α regula positivamente la actividad de Rac-1 en cardiomiocitos mantenidos en presencia de suero

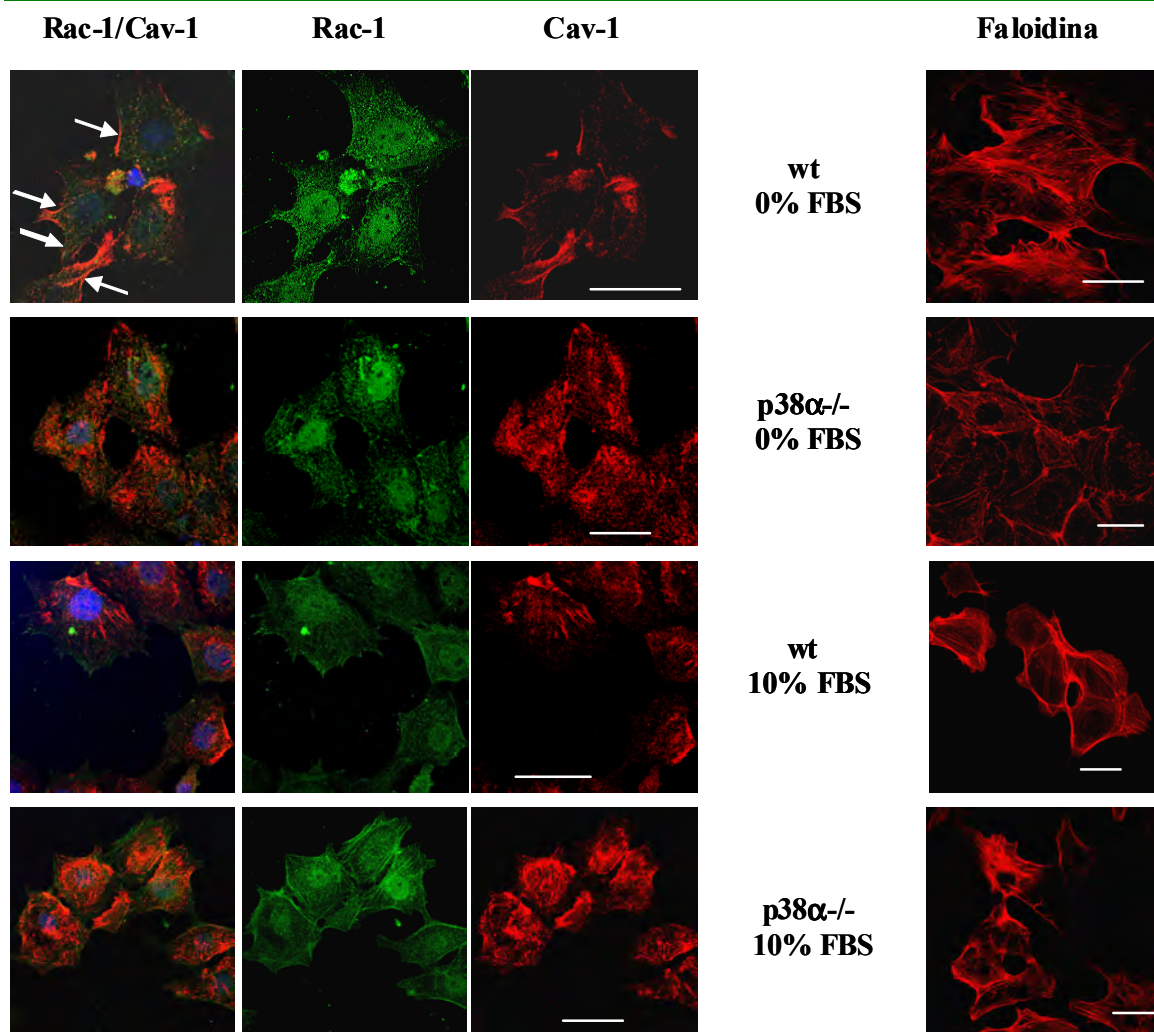


Los cardiomiocitos confluentes de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α -/-) fueron mantenidos en presencia (+FBS) o ausencia de suero (-FBS) durante 16h, y tratados o no con SB203580, según se indica. A) Panel izquierdo, niveles de Rac-1-GTP normalizados con Rac-1 total, cuantificados mediante densitometría de los Western-blot (valor arbitrario, media de 3 experimentos). Panel derecho, análisis mediante Western-blot de los niveles de P-ERKs, P-Akt, P-p38 and P-MK-2 normalizados con β-actina. Los niveles de P-p38 α aparecen cuantificados. B) Inmunoprecipitación de caveolina-1 a partir de extractos de células confluentes y análisis mediante Western Blot de Rac-1 y caveolina-1. Los histogramas representan los niveles de Rac-1 presentes en los inmunoprecipitados cuantificados mediante densitometría de los Western-blot (valores medios \pm S.E.M, n=3). C) Panel izquierdo, co-inmunoprecipitación de Rac-1 con caveolina-1; panel derecho, niveles de Rac-1-GTP en células a 100% y 80% de confluencia, según se indica.

1.3 Regulación de la localización subcelular de Rac-1 y caveolina-1 y de la actividad de Rac-1 por cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por la ausencia de suero y mediados por p38 α

Dado que Rac-1 co-inmunoprecipitaba con caveolina-1 en los cardiomiocitos que expresan p38 α mantenidos sin suero y la mayor activación de Rac-1 en estas condiciones, analizamos la localización subcelular de Rac-1 y caveolina-1 mediante microscopía confocal para ver si colocalizaban en membrana. Se detectó la presencia de una fracción de Rac-1 en la membrana, colocalizando con caveolina-1 en las células de fenotipo silvestre mantenidas sin suero. La ausencia de p38 α indujo una internalización de Rac-1 y caveolina-1, dificultando la colocalización de ambas proteínas (Fig. 34). Por el contrario, cuando las células eran mantenidas en presencia de suero, encontrábamos una alta fracción de Rac-1 en la membrana de las células deficientes en p38 α , pero no colocalizaba con caveolina-1. Esto era debido a que la caveolina-1 se encontraba internalizada, tanto en los cardiomiocitos que carecían de p38 α como en aquellos que la expresaban. Por otro lado, la tinción con faloidina reveló una desorganización del citoesqueleto de actina en las células deficientes en p38 α (Fig.34) en respuesta a la retirada de suero, observándose un número muy reducido de fibras de estrés. Esta disminución en la formación de fibras de estrés podría influir en la alta tasa de internalización de caveolina-1 que presentaban estas células. Para analizar esta posibilidad, se hizo un tratamiento con citocalasina D, que induce la desorganización del citoesqueleto de actina.

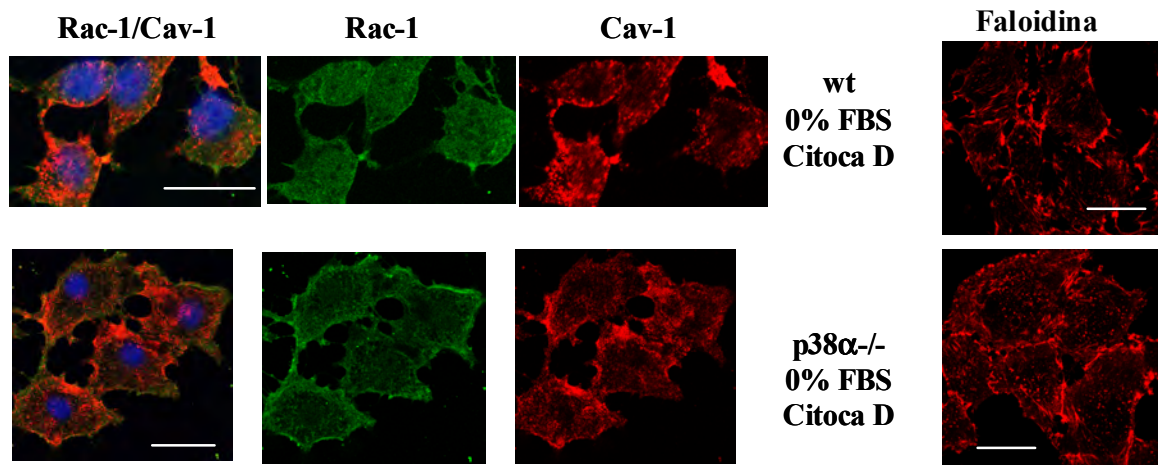
Figura 34: Análisis mediante microscopía confocal de Rac-1, caveolina-1 y actina



Los cardiomiocitos de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en $p38\alpha$ ($p38\alpha^{-/-}$) fueron mantenidos en ausencia o presencia de suero durante 24h, según se indica. Rac-1 fue detectado con un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde), la caveolina-1 con uno marcado con Cy3 (rojo), los núcleos mediante tinción con DAPI (azul) y los filamentos de actina mediante tinción con faloidina-TRITC (rojo). Las flechas indican colocalización de Rac-1 y caveolina-1 en membrana. La barra marca 25 μ m.

Como se puede observar, dicho tratamiento impidió la formación de fibras de estrés y dio lugar a una internalización de caveolina-1, principalmente en las células que expresaban $p38\alpha$, ya que en las células deficientes en $p38\alpha$, ya estaba internalizada. Dicha internalización impedía la colocalización de Rac-1 y caveolina-1 en membrana (Fig. 35).

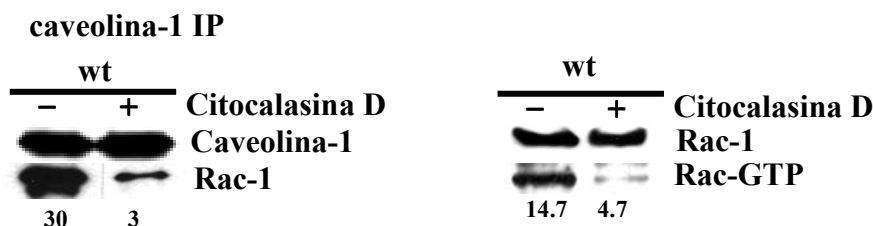
Figura 35: Efecto del tratamiento con citocalasina D en cardiomiocitos mantenidos sin suero



Los cardiomiocitos de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en $p38\alpha$ ($p38\alpha^{-/-}$) fueron mantenidos sin suero durante 24h, tratadas o no con citocalasina D durante 1h, según se indica. Rac-1 fue detectado con un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde), la caveolina-1 con uno marcado con Cy3 (rojo), los núcleos mediante tinción con DAPI (azul) y los filamentos de actina mediante tinción con faloidina-TRITC (rojo). La barra marca 25 μm .

Dado que la desorganización del citoesqueleto producida por la citocalasina D impedía la colocalización de Rac-1 y caveolina-1 en la membrana, quisimos analizar si también interfería en la formación de los complejos caveolina-1-Rac-1. El análisis de los inmunoprecipitados de caveolina-1 reveló que el tratamiento con citocalasina D de las células de fenotipo silvestre mantenidas sin suero provocaba una disminución muy significativa en la formación de los complejos caveolina-1-Rac-1, así como un fuerte descenso de los niveles de Rac-1-GTP (Fig. 36).

Figura 36: La desorganización del citoesqueleto de actina impide la formación de complejos caveolina-1-Rac-1



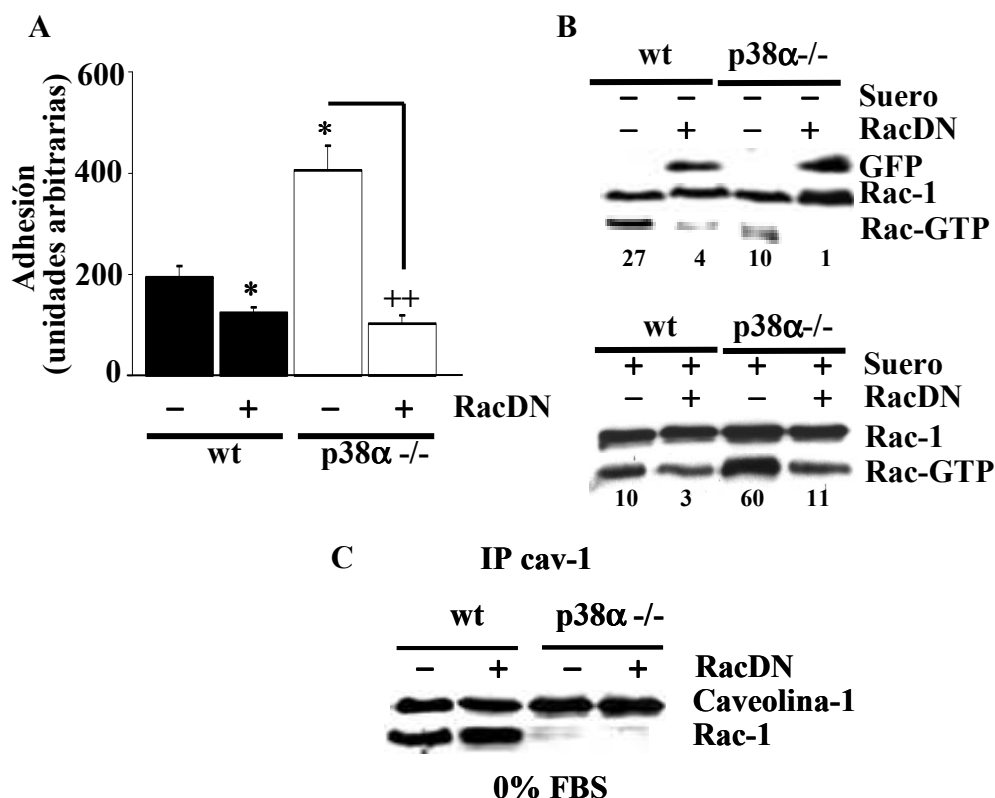
Los cardiomiocitos de fenotipo silvestre fueron mantenidos sin suero durante 24h, tratados o no con citocalasina D durante 1h, según se indica. A) Inmunoprecipitación de caveolina-1 a partir de extractos de células confluentes y análisis mediante Western-blot de Rac-1 y caveolina-1. Cuantificación de los niveles de Rac-1 presentes mediante densitometría de los Western-blots (valores medios, n=3). B) Niveles de Rac-1-GTP normalizados con Rac-1 total, cuantificados mediante densitometría de los Western-blots (valores medios, n=3).

Estos resultados indican que la p38 α es necesaria para que el citoesqueleto de actina forme fibras de estrés en cardiomiocitos mantenidos sin suero, lo cual permite la interacción de Rac-1 y caveolina-1 en la membrana favoreciéndose la activación de Rac-1.

1.4 p38 α regula la adhesión celular a través de Rac-1

La capacidad de Rac-1 para regular la adhesión celular (revisado por Bustelo 2002) nos indujo a estudiar si las diferencias observadas en los niveles de Rac-1-GTP podrían afectar a la adhesión celular en presencia de suero. Encontramos que la mayor actividad de Rac-1 de las células deficientes en p38 α se correlacionaba con una mayor adhesión (Fig. 37). Esto sugería que p38 α regulaba negativamente la actividad de Rac-1, lo cual, daba lugar a una disminución en la adhesión. Para estudiar el papel de Rac-1 en la adhesión, generamos clones de células con expresión estable de un mutante dominante negativo de Rac-1 (DNRac-1). Observamos que en las células que expresaban este mutante de Rac-1 se producía una disminución en la adhesión, así como en los niveles de Rac-1-GTP en ambos tipos celulares.

Figura 37: La expresión de un dominante negativo de Rac-1 bloquea el aumento de la adhesión producido por la ausencia de p38 α



Los cardiomiocitos de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α -/-) sin transfectar o transfectados con el mutante dominante negativo de Rac-1 (Rac-1 N17 o GFP-Rac1 N17) se mantuvieron con o sin suero, según se indica. A) Efecto de Rac-1 N17 sobre la adhesión. Las células se sembraron en un medio suplementado con 10% FBS y 30 minutos después, se cuantificaron las células adheridas a la placa mediante tinción con cristal violeta (* $p < 0,05$ en comparación con células wt sin transfectar; ** $p < 0,001$ respecto a p38 α -/- sin RacDN). B) Efecto de GFP-Rac-1 N17 sobre los niveles de Rac-1-GTP. Las células fueron mantenidas en ausencia (panel superior) o presencia (panel inferior) de suero. Se muestran los niveles de Rac-1-GTP normalizados con Rac-1 total y cuantificados mediante densitometría de los Western-blots (valores medios \pm S.E.M, $n=3$). C) Efecto de Rac-1 N17 sobre la formación de los complejos entre caveolina-1 y Rac-1 en células mantenidas sin suero. Inmunoprecipitación de caveolina-1 y análisis mediante Western Blot de Rac-1 y caveolina-1. Cuantificación de los niveles de Rac-1 presentes mediante densitometría de los Western-blots (valores medios \pm S.E.M, $n=3$).

2. C3G REGULA NEGATIVAMENTE A p38 MAPK EN RESPUESTA A ESTRÉS POR UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE RAP-1: PAPEL EN LA MUERTE CELULAR

Las p38 MAPKs, son un grupo de proteínas quinasas activadas principalmente por estrés y citoquinas proinflamatorias, aunque también pueden ser activadas por otros estímulos (revisado por Nebreda y Porras 2000; Ono y Han 2000). Regulan diferentes funciones celulares, entre las que destaca la muerte celular. En particular, la isoforma p38 α , juega un importante papel en la regulación de la apoptosis en respuesta a diferentes estímulos (revisado por Nebreda y Porras 2000; Ono y Han 2000), ejerciendo así una función como supresor de tumores en la transformación inducida por el oncogén H-ras (Shin et al. 2005).

C3G, como ya se describió en la introducción, es un factor activador del intercambio de nucleótidos de dos miembros de la familia Ras: R-Ras y Rap-1 (Gotoh et al. 1995; Gotoh et al. 1997), aunque también ejerce funciones a través de mecanismos independientes de su actividad como GEF (Guerrero et al. 1998; Guerrero et al. 2004). De hecho, C3G actúa como supresor de la transformación inducida por varios oncogenes incluido H-ras^{Lys12}, en parte, a través de la regulación negativa de la actividad de las ERKs por un mecanismo mediado por la fosfatasa PP2A que no requiere de su actividad como GEF (Martin-Encabo et al. 2007). A su vez, C3G es un mediador de apoptosis en células hematopoyéticas (Shivakrupa et al. 2003), aunque en una línea de neuroblastoma es capaz de inducir supervivencia (Radha et al. 2008).

Teniendo en cuenta que tanto p38 α como C3G pueden actuar como supresores de tumores y que ambas regulan positivamente la actividad de la fosfatasa PP2A (Martin-Encabo et al. 2007; Zuluaga et al. 2007), cabía la posibilidad de que actuaran a través de la misma ruta. A favor de esto, también estaría la capacidad de estas proteínas para inducir apoptosis (revisado por Nebreda y Porras 2000; Shivakrupa et al. 2003; Cuenda y Rousseau 2007). Por otro lado, había datos en la bibliografía que indicaban que Rap-1 podía regular a las p38 MAPKs (Palsson, 2000; McDermott y O'Neill 2002; Stork 2005). Por tanto, nos planteamos la hipótesis de que C3G y p38 α MAPK podrían formar parte de una ruta común, existiendo interacciones entre ambas proteínas. A su vez, Rap-1 podría actuar como un mediador entre C3G y p38 α .

Esta posible interrelación entre C3G y p38 α fue analizada en dos modelos celulares diferentes: en la línea celular de leucemia mieloide crónica (LMC) K562, en colaboración con el grupo de la Dra. Guerrero, y en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). De esta forma, se podría establecer la función de la regulación cruzada entre C3G y p38 α en un modelo de células tumorales, en donde C3G tiene un patrón de expresión alterada (K562), y en células no tumorales como son los MEFs.

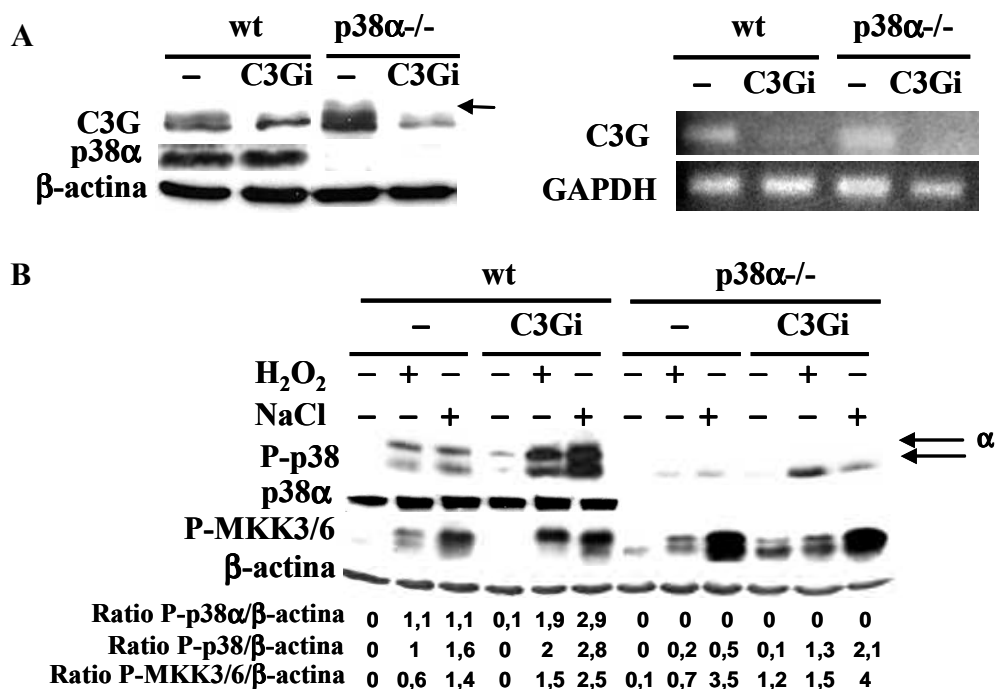
2.1 C3G regula negativamente la actividad de p38 α MAPK en respuesta a estrés

Se analizaron las posibles interacciones existentes entre C3G y p38 MAPK en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) bajo condiciones de estrés oxidativo y estrés osmótico, con el objetivo de establecer si C3G regulaba la actividad de p38 α MAPK y si ambas proteínas colaboraban regulando la respuesta a estrés en células no tumorales.

Para realizar estos estudios, generamos líneas de MEFs estables que presentaban un silenciamiento de C3G mediante transfección de una construcción que llevaba un shRNA para C3G (shC3G) en fibroblastos de fenotipo silvestre (wt) y deficientes en p38 α (p38 α -/-). La transfección de la construcción con el shC3G disminuyó, tanto los niveles de proteína como los de RNAm de C3G, en las células deficientes en p38 α y en las de fenotipo salvaje, tal y como se muestra en la figura 38A. Por tanto, una vez probado el silenciamiento de C3G utilizamos estos clones, y otros que no se muestran, para analizar la regulación de p38 α por C3G en respuesta a estrés.

La estimulación con H₂O₂ y NaCl indujo una alta fosforilación de dos isoformas de p38MAPK, p38 α y otra de mayor movilidad en los MEFs de fenotipo silvestre (Fig 38B). El silenciamiento génico de C3G (C3Gi) aumentó los niveles de fosforilación de las p38 MAPKs en respuesta a los tratamientos de estrés, especialmente en respuesta al estrés osmótico (Fig. 38B). En las células deficientes en p38 α el silenciamiento de C3G produjo un efecto similar, aunque debido a la falta de p38 α , solo se detectó el aumento de fosforilación en la isoforma de mayor movilidad electroforética (Fig. 38B). Se obtuvieron datos similares en todos los clones analizados, aunque sólo se muestran los datos de un clon representativo en la figura 38.

Figura 38: El silenciamiento génico de C3G regula positivamente la ruta de las p38MAPK en respuesta a estrés

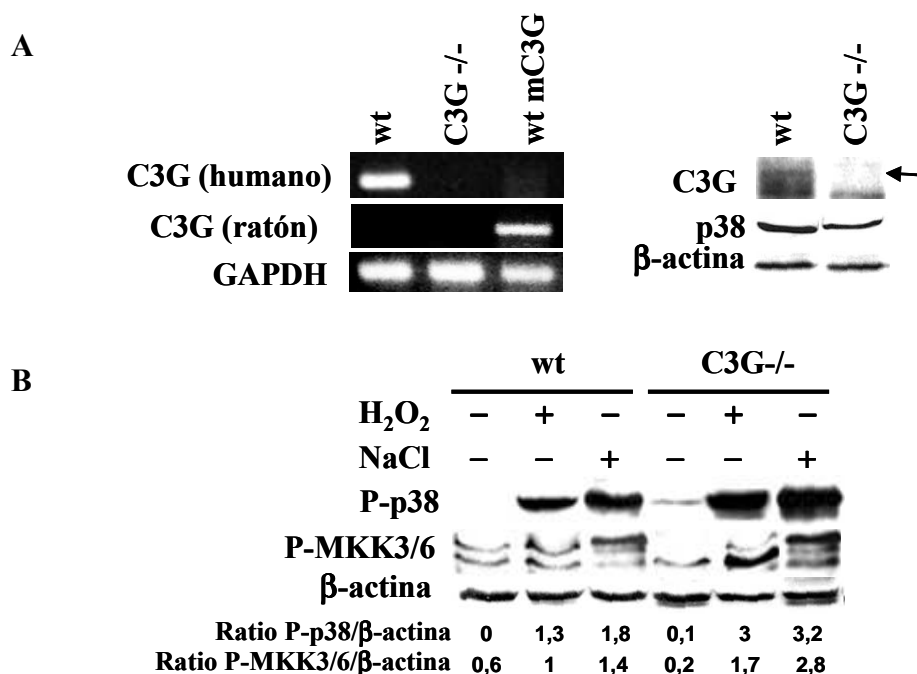


Los fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α -/-) con (C3Gi) o sin silenciamiento de C3G (-) fueron mantenidos en presencia de suero. A) Descenso en la expresión de C3G tras el silenciamiento con el shRNA. Panel de la izquierda, niveles de C3G analizados mediante Western-blot y normalizados con β -actina; panel de la derecha; análisis mediante RT-PCR de los niveles de RNAm normalizados con GAPDH. B) Análisis mediante Western-blot de los niveles de P-p38, P-MKK3/6 y p38 α normalizadas con β -actina en respuesta a una estimulación con H₂O₂ (1mM) o NaCl (0,5 M) durante 20 min., tal y como se indica. Los números corresponden a la cuantificación mediante análisis densitométrico de los Western-blot para las proteínas indicadas (valor medio; n=3).

Para confirmar la regulación de p38 ejercida por C3G, usamos otro abordaje experimental. Generamos células deficientes en C3G (C3G-/-) a partir de MEFs deficientes en C3G de ratón rescatados con una construcción que contenía el cDNA de G3G humano con los exones 15 y 16 flanqueados con secuencias loxP. Tras la infección con partículas adenovirales con la recombinasa Cre (ver detalles en la sección de materiales y métodos) se obtuvieron clones de células con los exones 15 y 16 de G3G humano deletados. Esas células eran deficientes tanto en C3G humano (cDNA) como de ratón (mC3G), tal y como se muestra en la figura 39A (panel de la izquierda) mediante análisis por PCR. Como cabía esperar, tampoco se detectó presencia de la proteína C3G en el análisis realizado mediante Western-Blot (véase banda superior, figura 39A, panel de la derecha). Usando este clon representativo se vio, que al igual

que en las células que presentaban el silenciamiento de C3G, los niveles de p38 fosforilado eran superiores en las células deficientes en C3G (C3G^{-/-}), con respecto a las células de fenotipo salvaje parentales (wt) en respuesta a estrés oxidativo (H₂O₂) y a estrés osmótico (NaCl) (Fig 39B). Se obtuvieron resultados similares con diferentes clones (datos no mostrados). Acorde con este resultado, detectamos mayores niveles de fosforilación de las quinasas activadoras de p38, MKK3/6, en las células C3G^{-/-} que en las células de fenotipo silvestre (Fig. 39B). Estos resultados demuestran la regulación negativa de p38 MAPK (principalmente de la isoforma α) por C3G en respuesta a estímulos de estrés.

Figura 39: La deficiencia de C3G regula positivamente la ruta de las p38MAPK en respuesta a estrés



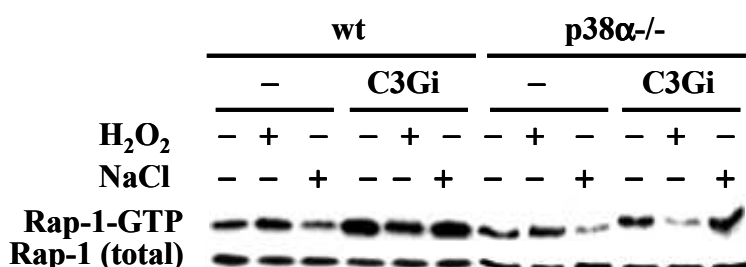
Fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (deficientes en C3G rescatados con el cDNA de C3G humano, wt) o deficientes en C3G (C3G^{-/-}) mantenidos en presencia de suero. A) Ausencia de expresión de C3G en las células deficientes en C3G. Panel de la izquierda, análisis mediante PCR de la expresión del cDNA de C3G humano y del DNA de C3G de ratón en los MEFs parentales (wt) y en los C3G^{-/-} utilizando MEFs wt con C3G de ratón (wt mC3G) como control positivo de la expresión de C3G de ratón. Panel de la derecha, análisis de la expresión de la proteína C3G mediante Western-blot normalizado con β-actina. B) Análisis mediante Western-blot de los niveles de P-p38, P-MKK3/6 y p38 α normalizadas con β-actina en respuesta a una estimulación con H₂O₂ (1mM) o NaCl (0,5 M) durante 20 min., tal y como se indica. Los números corresponden a la cuantificación mediante análisis densitométrico de los Western-blot para las proteínas indicadas (valor medio; n=3).

2.2 La regulación de p38 α MAPK por C3G no está mediada por Rap-1

Como ya hemos indicado, Rap-1 es el principal efector de C3G (revisado por Dillon et al. 2005), aunque C3G también puede actuar a través de mecanismos independientes de Rap-1 (Guerrero et al. 1998; Guerrero et al. 2004). Además, Rap-1 puede regular la actividad de las p38 MAPK (McDermott y O'Neill 2002), tanto de forma positiva como negativa (Palsson et al. 2000; Stork 2005). Por ello, quisimos analizar si en nuestro modelo celular, la regulación negativa de la actividad de p38 α MAPK por C3G en respuesta a estrés estaba mediada por Rap-1 como ocurría en la línea de CML K562 (Maia et al. 2009).

Primero, analizamos los niveles de Rap-1-GTP en las células silenciadas. Dado que C3G es un activador de Rap-1, cabía esperar unos niveles menores de Rap-1-GTP en las células con silenciamiento de C3G. Sin embargo, como se puede observar en la figura 40, encontramos que la actividad basal de Rap-1 estaba incrementaba en las células de fenotipo silvestre con silenciamiento de C3G. El tratamiento con H₂O₂ aumentó ligeramente los niveles de Rap-1-GTP en las células de fenotipo silvestre que expresaban C3G, mientras que tenía un efecto opuesto cuando C3G había sido silenciado (Fig. 40). Por el contrario, el tratamiento con NaCl reducía ligeramente los niveles de Rap-1-GTP en las células de fenotipo salvaje que expresaban C3G, mientras que aumentaba en las células con C3G silenciado (Fig. 40). A su vez, en las células deficientes en p38 α se observó un perfil de cambios semejante. Por tanto, en base a estos resultados no pudimos establecer una correlación directa entre el silenciamiento de C3G y la actividad de Rap-1.

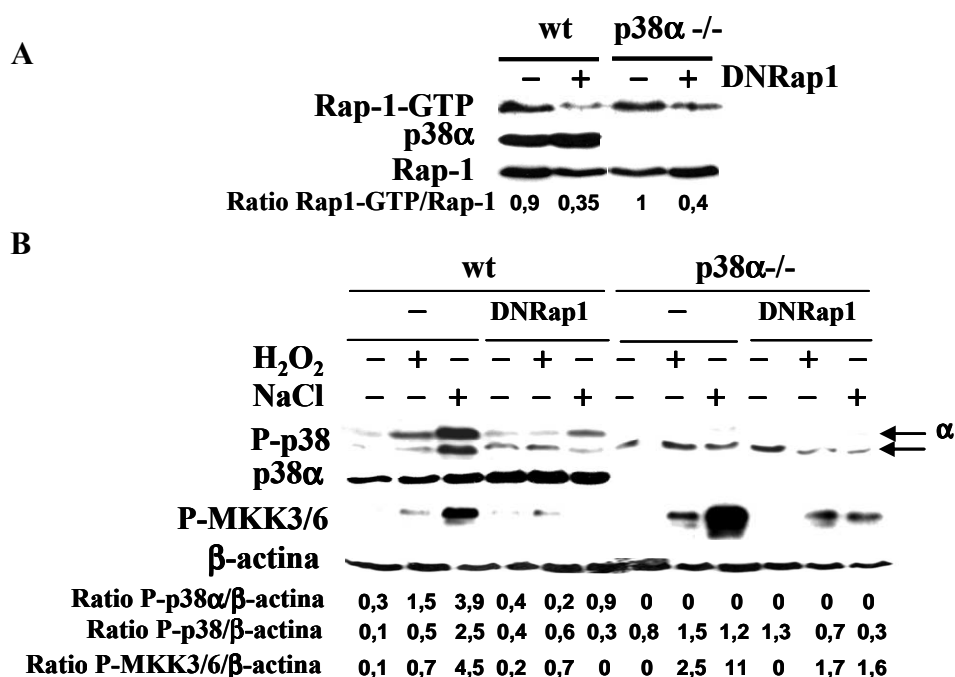
Figura 40: Niveles de activación de Rap-1 en células que expresan C3G y células con la expresión de C3G silenciada



Los fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α ^{-/-}) con (C3Gi) o sin silenciamiento de C3G (-) fueron mantenidos en presencia de suero y tratados con H₂O₂ (1mM) o NaCl (0,5 M) durante 20 min, según se indica. Niveles de Rap-1-GTP normalizado con respecto a Rap-1 total.

Este resultado puede deberse a la complejidad en la regulación de la actividad de Rap-1, dado que existen más de cinco GEFs capaces de regular a esta proteína, tal y como hemos descrito en la introducción. Por ello, para estudiar el papel que juega Rap-1 en la regulación de p38 α por C3G decidimos generar clones de células con expresión estable de un mutante dominante negativo de Rap-1 (DNRap-1). Tal y como se muestra en la figura 41A, los niveles de Rap-1-GTP disminuyeron significativamente en las células que expresaban este mutante de Rap-1, tanto en aquellas que expresan p38 α como en las deficientes en dicha proteína. Utilizando clones representativos que expresaban el mutante DNRap-1, vimos que en respuesta al tratamiento con H₂O₂ y NaCl, éstos presentaban una menor activación de p38 α en el caso de las células que expresaban p38 α (Fig. 41B). La activación de otra isoforma de p38 MAPK de mayor movilidad fue similar o ligeramente menor cuando se expresaba el dominante negativo de Rap-1. De acuerdo con esto, las células con expresión del mutante de Rap-1 también presentaban menores niveles de activación de MKK3/6 (Fig. 41B).

Figura 41: Papel de Rap-1 en la regulación de p38 MAPK por C3G



Fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α -/-) transfectados con el vector vacío (-) o con la construcción con el mutante dominante negativo de Rap-1 (DNRap1) mantenidos con suero. A) Actividad de Rap-1 basal. Se muestra el análisis densitométrico de los niveles de Rap-1-GTP normalizado con respecto a Rap-1 total (valor medio; n=3). B) Efecto del mutante dominante negativo de Rap-1 sobre la respuesta a estrés oxidativo (H₂O₂ 1mM) u osmótico (NaCl 0,5 M) tras un tratamiento de 20 min. Análisis mediante Western-blot de los niveles de P-p38, P-MKK3/6 y p38 α normalizadas con β -actina. Se muestran los valores medios del análisis densitométrico respecto a β -actina (valor medio; n=3).

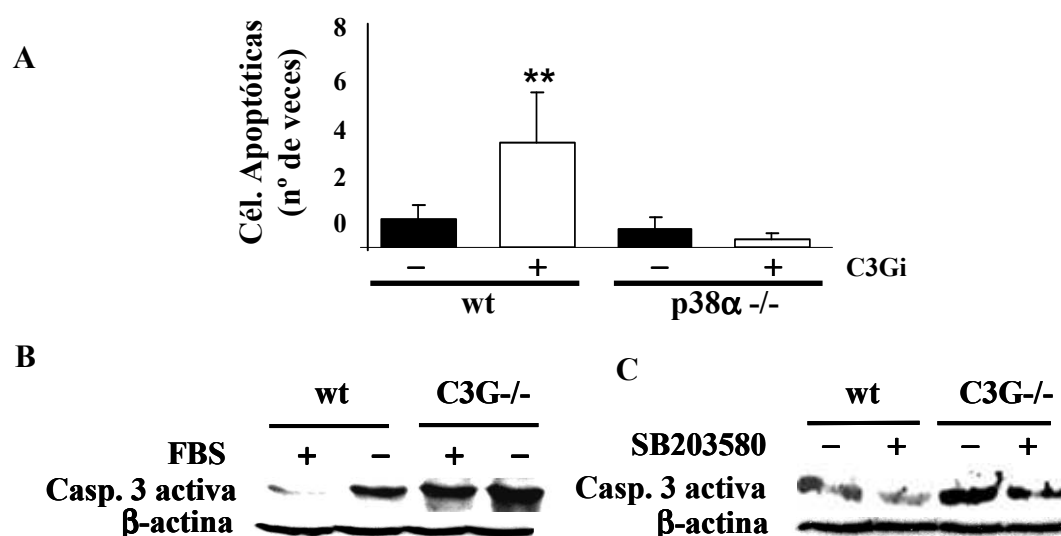
Estos resultados indican que el silenciamiento o la deficiencia de C3G no ejercen el mismo efecto que la inhibición de Rap-1 sobre la actividad de p38 en respuesta a estrés. Más aún, estas dos proteínas parecen jugar papeles opuestos, de forma que C3G sería un regulador negativo de p38 α , mientras que Rap-1 sería un regulador positivo. Por tanto, Rap-1 no sería el mediador de los efectos de C3G sobre p38 α MAPK.

2.3 Regulación de la muerte celular por C3G/p38 α MAPK y Rap-1

Habíamos visto que el silenciamiento o la ausencia de expresión de C3G incrementaba la activación de p38 (principalmente de la isoforma α) en respuesta a estímulos de estrés. Estos resultados, junto con el importante papel ejercido por p38 α MAPK en la regulación de la apoptosis (revisado por Nebreda y Porras 2000; Cuenda y Rousseau 2007), nos hizo plantearnos la posibilidad de que C3G pudiese jugar un posible papel antiapoptótico en base a su capacidad para inhibir la activación de p38 MAPK en respuesta a estímulos de estrés. Por tanto, decidimos primero analizar el papel jugado por C3G en la regulación de la muerte celular inducida por ausencia de suero, en la cual, sabíamos que p38 α era un mediador importante (Porras et al. 2004).

Tal y como se muestra en la figura 42A, el silenciamiento de C3G incrementó el número de células apoptóticas de una manera significativa sólo en los MEFs que expresan p38 α . A su vez, en las células deficientes en C3G (C3G $^{-/-}$), la activación de la caspasa 3 producida por la ausencia de suero también era superior que en los MEFs de fenotipo silvestre (Fig. 42B), y dicha activación disminuía tras la inhibición de p38 α/β con SB203580 (Fig. 42C). Cabe señalar, que los niveles de caspasa 3 activa eran mayores en las células deficientes en C3G (C3G $^{-/-}$) incluso en presencia de suero, sugiriendo un papel antiapoptótico de C3G en estas células, ya incluso en el estado basal. Todos estos datos indicaban que C3G podría estar mediando supervivencia en respuesta a la retirada de suero mediante un mecanismo que implica la regulación negativa de la actividad de p38 α .

Figura 42: C3G media supervivencia a través de un mecanismo dependiente de p38αMAPK en células privadas de suero

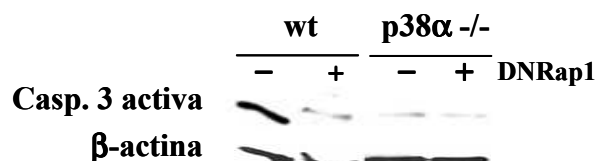


Fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (wt) y deficientes en p38α (p38α^{-/-}) con (C3Gi) o sin silenciamiento de C3G (-), o deficientes en C3G (C3G^{-/-}) mantenidos con o sin suero durante 24h. A) Efecto del silenciamiento génico de C3G sobre la apoptosis. Cuantificación del número de células apoptóticas (pico sub-G₀/1) mediante análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Los resultados se expresan como número de veces de aumento respecto al control. (** $p < 0,01$) wt-C3Gi/wt MEFs. B) Efecto de la ausencia de C3G (C3G^{-/-}) sobre la apoptosis cuantificada mediante análisis de los niveles de caspasa 3 activa por Western-blot. Panel izquierdo, efecto de la retirada de suero; panel derecho, efecto del tratamiento con SB203580 (5μM).

Aunque ya habíamos mostrado que Rap-1 y C3G jugaban papeles opuestos en la regulación de la actividad de p38α MAPK, quisimos determinar si Rap-1 podría ser mediador de los efectos antiapoptóticos presentados por C3G en condiciones de ausencia de suero.

Tal y como se muestra en la figura 43, la activación de caspasa 3 inducida por la retirada de suero disminuyó en los MEFs de fenotipo silvestre que expresaban el mutante dominante negativo de Rap-1. En las células deficientes en p38α los niveles de activación de caspasa 3 eran ya muy bajos y se mantuvieron inalterados bajo la expresión del mutante de Rap-1

Figura 43: Rap-1 media muerte celular a través de un mecanismo dependiente de p38αMAPK en células mantenidas en ausencia de suero

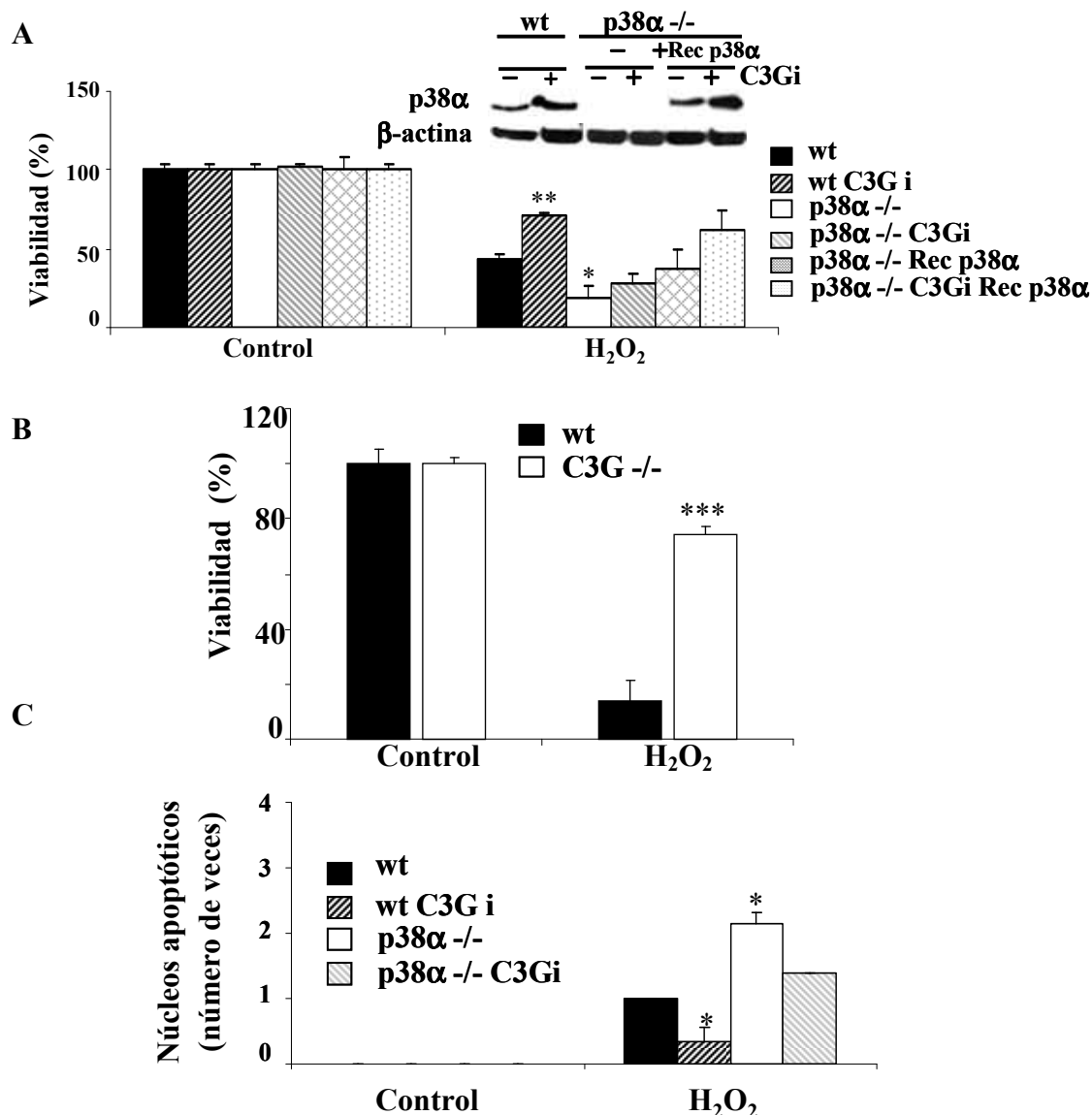


Fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38α (p38α-/-) transfectados con el vector vacío (-) o con la construcción con el mutante dominante negativo de Rap-1 (DNRap1) mantenidos sin suero durante 24h. Análisis de los niveles de caspasa 3 activa mediante por Western-blot normalizados con β-actina.

Quisimos establecer si la cascada C3G/p38αMAPK podría jugar un papel similar en el proceso de muerte celular inducida por estrés oxidativo. Por ello, decidimos estudiar el efecto del H₂O₂ sobre la viabilidad celular en los MEFs donde se había silenciado C3G (con o sin expresión de p38α) y en las células deficientes en C3G. Encontramos que el H₂O₂, disminuía la viabilidad celular en los fibroblastos que expresaban p38α (wt) y en los deficientes en dicha proteína (p38α-/-), pero sorprendentemente, en las células deficientes en p38α la viabilidad fue significativamente menor, tal y como se puede apreciar en la figura 44A. El silenciamiento de C3G bloqueó parcialmente la muerte celular inducida por H₂O₂, especialmente, en los MEFs de fenotipo silvestre, en donde su efecto fue significativo (**p<0,01). A su vez, el rescate de p38α en las células p38α-/- incrementó la viabilidad celular, pero de forma mucho más eficiente en las células con C3G silenciado (Fig. 44A). Por tanto, este resultado demostraba el papel ejercido por p38α como mediador de supervivencia en las células con C3G silenciado, en donde habíamos visto que la activación de p38α estaba incrementada. Para confirmar este efecto de C3G, utilizamos las células deficientes en C3G (C3G-/-). Como se puede observar en la figura 44B, la viabilidad celular tras el tratamiento con H₂O₂ fue muy superior en las células deficientes en C3G (C3G-/-) con respecto a las que expresan C3G. Cabe señalar, que los MEFs wt y C3G-/- fueron obtenidos de un estadio embrionario diferente que las p38α -/- y sus respectivos controles (wt), tal y como se comentó en la sección material y métodos. Esta diferencia podría explicar las diferencias en viabilidad celular entre los dos clones de fenotipo silvestre usados como controles. Todos estos resultados indican que C3G es un mediador de la muerte celular inducida por H₂O₂ a través de un

mecanismo dependiente, principalmente, de la disminución de la actividad de p38 α MAPK.

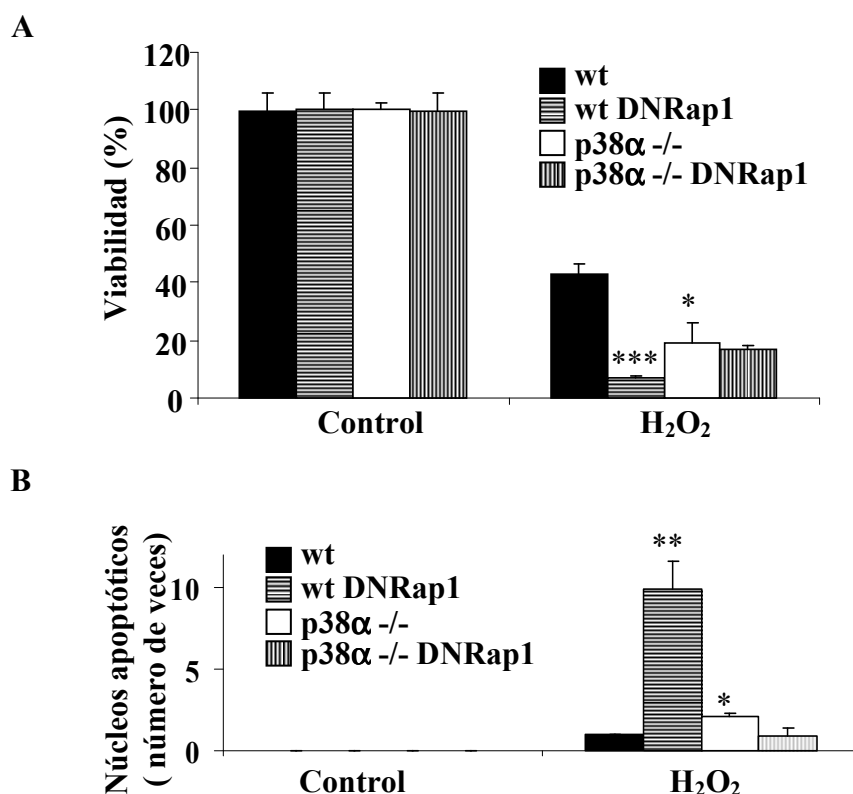
Figura 44: El silenciamiento o la ausencia de C3G induce supervivencia en células tratadas con H₂O₂ a través de un mecanismo dependiente de p38 α MAPK



Los MEFs fueron mantenidos en presencia de suero y tratadas con H₂O₂ (1mM) durante 6h. A) Efecto del silenciamiento génico de C3G en la viabilidad celular en MEFs wt, p38 α -/- y p38 α -/- reconstituidas con p38 α (Rec p38 α) con (C3Gi) o sin silenciamiento de C3G (-). (**p<0,01) wt-C3Gi respecto a wt MEFs y (*p<0,05) p38 α -/- respecto a wt MEFs. Panel superior, análisis de la expresión de p38 α mediante western-blot mostrado como control del rescate de p38 α . B) Efecto de la ausencia de expresión de C3G (C3G -/-) en la viabilidad celular. (***p<0,001) C3G -/- respecto a wt MEFs. (A, B) Los resultados se expresan como el porcentaje respecto a su control, que es considerado como 100% en todos los casos. C) Efecto del silenciamiento de C3G en apoptosis. El histograma representa los cambios en el número de núcleos apoptóticos expresado como número de veces respecto a las células control (wt) considerado como 1. (*p<0,05) wt-C3Gi y p38 α -/- respecto a wt MEFs.

Para determinar la contribución de la apoptosis a este proceso de muerte celular, analizamos el número de núcleos condensados y/o fragmentados (apoptóticos). Tal y como esperábamos, el número de núcleos apoptóticos fue mucho mayor en las células deficientes en p38 α que en las células de fenotipo silvestre y el silenciamiento génico de C3G disminuyó su número (Fig. 44C). Por tanto, en nuestro modelo celular, p38 α sería un protector de la muerte celular inducida por H₂O₂, mientras que C3G sería un mediador de dicho proceso a través de la regulación negativa de p38 α .

Figura 45: Rap-1 protege de la muerte celular inducida por H₂O₂



Los MEFs de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α -/-) transfectados con el vector vacío (-) o con la construcción con el mutante dominante negativo de Rap-1 (DNRap1) fueron mantenidas en presencia de suero y tratadas con H₂O₂ (1mM) durante 6h. A) Análisis de la viabilidad celular. (***) $p < 0,001$ wt DNRap-1 respecto a wt y (*) $p < 0,05$ p38 α -/- respecto a wt. B) Cuantificación de apoptosis. El histograma representa el número de núcleos apoptóticos expresado como número de veces de aumento respecto a las células control considerado como 1 (wt). (**) $p < 0,01$ wtDNRap-1 respecto a wt y (*) $p < 0,05$ p38 α -/- respecto a wt.

Para establecer el papel ejercido por Rap-1, como potencial mediador de las acciones de C3G en este proceso de muerte celular, examinamos el efecto de la expresión del mutante dominante negativo de Rap-1 sobre la viabilidad celular en células tratadas con H₂O₂. Tal y como se muestra en la figura 45A, la viabilidad

disminuyó de forma muy significativa en los MEFs de fenotipo silvestre que expresaban el mutante de Rap-1, alcanzándose valores de viabilidad menores a los observados en las células deficientes en p38 α , en las cuales, el mutante dominante negativo de Rap-1 no tuvo ningún efecto significativo. De acuerdo con esto, el número de núcleos apoptóticos se incrementó muy significativamente en las células que expresaban p38 α y el mutante de Rap-1, mientras que en las células deficientes en p38 α , la expresión de este mutante no tuvo ningún efecto significativo (Fig. 45B).

2.4 Regulación de proteínas de la familia Bcl-2 por C3G y Rap-1 a través de mecanismos dependientes e independientes de p38 α MAPK

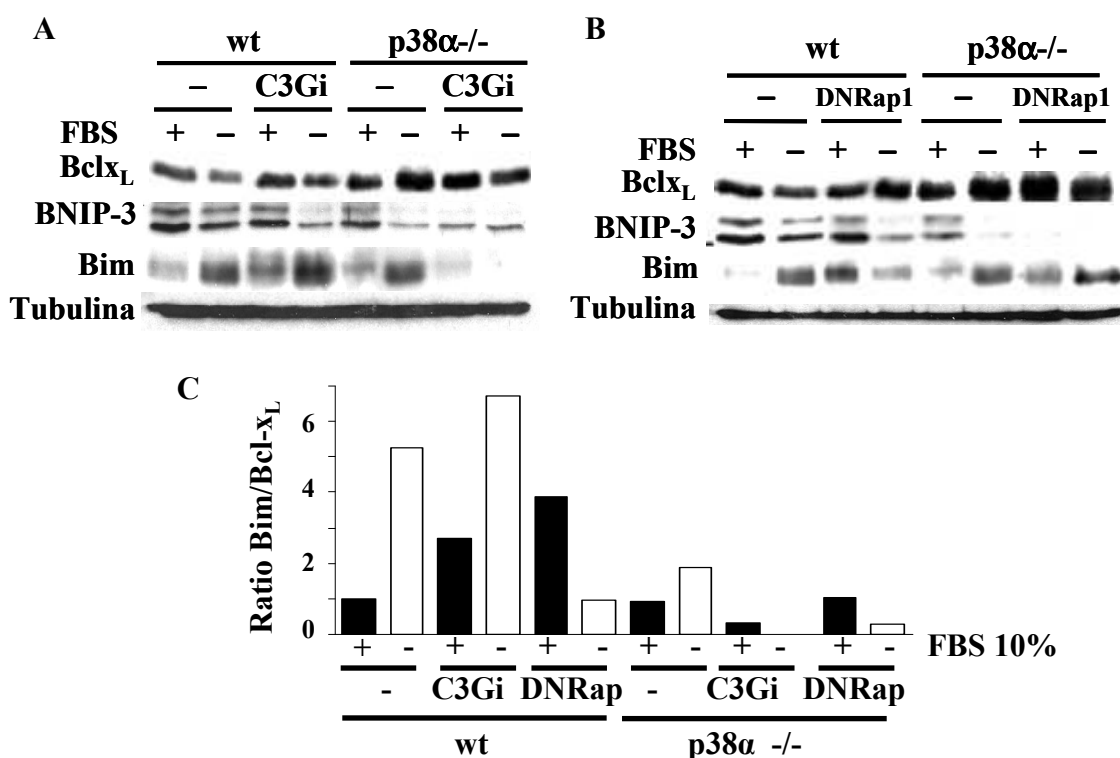
Tal y como se ha comentado en la introducción, se sabe que p38 α MAPK puede regular la expresión y/o la función de diferentes proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2. Por tanto, decidimos analizar los niveles de algunas de estas proteínas que pudieran ser relevantes en la muerte celular inducida por estrés oxidativo o ausencia de suero como son Bim, Bcl-x_L o BNIP-3. Por otro lado, nuestros datos de análisis de “microarrays de DNA” indicaban que los niveles del RNAm de BNIP-3 aumentaban en las células con silenciamiento de C3G (ver anexo 1).

Tal y como se muestra en la figura 46A y 46B, los niveles de la proteína proapoptótica Bim aumentaron en respuesta a la ausencia de suero, tanto en las células de fenotipo silvestre como en las deficientes en p38 α . Este aumento iba acompañado de una reducción en los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-x_L en las células que expresaban p38 α (Fig. 46A). El silenciamiento de C3G incrementó los niveles de Bim en las células que expresaban p38 α , mientras que produjo el efecto opuesto en las deficientes en esta proteína (Fig. 46A). Además, las células deficientes en p38 α , tanto con silenciamiento de C3G como sin él, mantenían altos niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-x_L (Fig. 46A y 46C). Por tanto, estos datos sugieren que el incremento en los niveles de Bim junto con un descenso en Bcl-x_L podrían ser mediadores de los altos niveles de apoptosis presentes en las células de fenotipo silvestre (con o sin silenciamiento de C3G) mantenidas sin suero. Además, el efecto del silenciamiento de C3G incrementando los niveles de muerte celular inducida por ausencia de suero en las células que expresan p38 α , podría también estar mediado por el aumento de los niveles de Bim a través de un mecanismo dependiente de p38 α .

De acuerdo con esto, la expresión del mutante dominante negativo de Rap-1 dio lugar a una reducción en los niveles de Bim, junto con un aumento en los niveles de Bcl-x_L, en respuesta a la ausencia de suero en las células que expresaban p38α. En las células deficientes en p38α, tanto con expresión del mutante de Rap-1 (DNRap-1) como sin ella, los niveles de Bcl-x_L se mantuvieron altos en respuesta a la ausencia de suero en paralelo con unos niveles moderados de Bim (Fig. 46B y 46C), lo cual, podría explicar sus bajos niveles de apoptosis.

Por otro lado, los niveles de BNIP-3 disminuyeron en respuesta a la ausencia de suero en todas las condiciones estudiadas (Fig. 46A y 46B), excepto en las células deficientes en p38α con C3G silenciado (C3Gi) o con expresión del mutante dominante negativo de Rap-1 (DNRap-1), en donde sus niveles ya eran muy bajos. Por tanto, la relevancia de BNIP-3 como regulador de la muerte celular bajo estas condiciones no está clara.

Figura 46: Regulación de proteínas de la familia Bcl-2 por C3G y Rap-1 a través de mecanismos dependientes e independientes de p38MAPK en respuesta a la retirada de suero



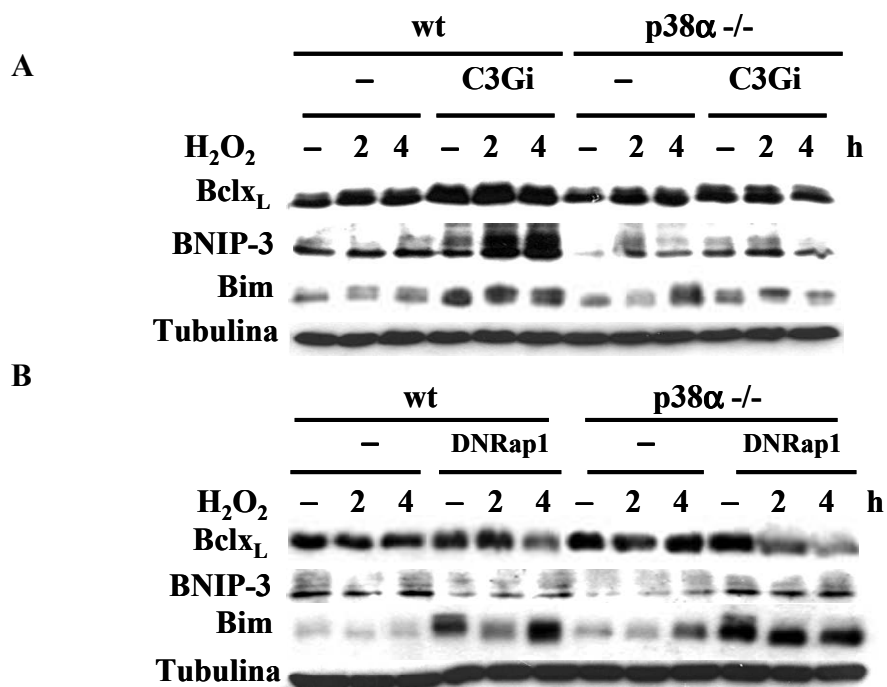
Los MEFs de fenotipo salvaje (wt) o deficientes en p38α (p38α^{-/-}) con (C3Gi) o sin silenciamiento de C3G o con expresión del mutante dominante negativo de Rap-1 (DNRap-1) fueron mantenidas con o sin suero durante 24h, según se indica. A) y B) Niveles proteicos de Bim, Bcl-x_L y BNIP-3 analizados mediante western-blot y normalizados con tubulina. C) El histograma muestra la relación de los valores del análisis densitométrico de los niveles de expresión de Bim respecto a Bcl-x_L normalizados con tubulina del experimento mostrado (representativo).

También analizamos si los cambios en estas proteínas podrían jugar algún papel en el proceso de muerte celular inducido por H_2O_2 , y cómo se regulaban por C3G y/o Rap-1 tanto a través de mecanismos dependientes como independientes de $p38\alpha$. Tal y como se muestra en la figura 47A, Bim aumentaba ligeramente en respuesta al tratamiento con H_2O_2 en las células de fenotipo silvestre, incrementándose de forma significativa en las células deficientes en $p38\alpha$ tras 4h de tratamiento. El silenciamiento de C3G indujo un fuerte incremento en los niveles de BNIP-3 tras el tratamiento de las células de fenotipo silvestre con H_2O_2 , mientras que los niveles de Bim y Bcl-x_L que ya estaban aumentados en condiciones basales, se mantuvieron altos durante el tratamiento con H_2O_2 (Fig. 47A). Por el contrario, en las células deficientes en $p38\alpha$, el silenciamiento de C3G no modificó significativamente los niveles de BNIP-3, mientras que dio lugar a un aumento ligero en los niveles de Bim y Bcl-x_L en condiciones basales que se mantuvo durante el tratamiento con H_2O_2 (Fig.47). Estos datos indican que BNIP-3 y Bcl-x_L podrían jugar un papel relevante como mediadores de la supervivencia celular en respuesta al estrés oxidativo en MEFs con silenciamiento génico de C3G que expresan $p38\alpha$.

De acuerdo con esta posible función de BNIP-3, la expresión del mutante dominante negativo de Rap-1 no indujo cambios significativos en los niveles de BNIP-3 en las células de fenotipo silvestre o en las deficientes en $p38\alpha$ (Fig. 47B). Sin embargo, se produjo un descenso en los niveles de Bcl-x_L en los MEFs que expresaban el dominante negativo de Rap-1 tras el tratamiento con H_2O_2 . Este descenso era más evidente en las células deficientes en $p38\alpha$. Además, la expresión de Bim estaba también muy incrementada en las células que expresan el mutante de Rap-1, lo cual también podría estar favoreciendo la muerte celular inducida por H_2O_2 (Fig. 47B).

En base a todos estos datos, podríamos proponer que la expresión de Bcl-x_L dependiente de $p38\alpha$ y la regulación positiva de BNIP-3 por $p38\alpha$, podrían ser las responsables de la mayor supervivencia observada en las células con silenciamiento de C3G que expresaban $p38\alpha$. Por el contrario, Rap-1 parece ejercer el efecto contrario, también a través de un mecanismo dependiente de $p38\alpha$.

Figura 47: Regulación de proteínas de la familia Bcl-2 por C3G y Rap-1 a través de mecanismos dependientes e independientes de p38MAPK: efecto del H₂O₂



Los MEFs de fenotipo salvaje (wt) o deficientes en p38α (p38α^{-/-}) con (C3Gi) o sin silenciamiento de C3G o con expresión del mutante dominante negativo de Rap-1 (DNRap-1) fueron mantenidas con suero y tratados con H₂O₂ durante 2 y 4h, según se indica. Niveles proteicos de Bim, Bcl-x_L y BNIP-3 analizados mediante western-blot y normalizados con tubulina. A) Efecto del silenciamiento de C3G. B) Efecto de la inhibición de Rap-1.

Todos estos datos indican que C3G es un mediador de la apoptosis celular inducida por H₂O₂ a través de la regulación negativa de la activación de p38α, mientras que Rap-1 jugaría un papel opuesto. A su vez, dependiendo del estímulo (ausencia de suero o H₂O₂) la función de ambas proteínas es diferente.

3. p38 α MAPK DESEMPEÑA UNA FUNCIÓN DUAL EN LA REGULACIÓN DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ESTRÉS OXIDATIVO

p38 α MAPK fue identificada como una proteína quinasa que coordina la respuesta celular a un amplio rango de tipos de estrés, incluyendo el estrés oxidativo. De hecho, se ha demostrado que p38 α está implicada en la mediación de procesos fisiológicos en respuesta a los especies reactivas de Oxígeno (ROS) endógenas, tales como la regulación de la vida útil de las células madres hematopoyéticas murinas (Ito et al. 2006). A su vez, resultados previos de nuestro laboratorio indican que la apoptosis inducida por el cisplatino requiere de la activación de la ruta de p38 α por p53, a través de la producción de ROS intracelulares, en la línea HCT116 de carcinoma de colon (Bragado et al. 2007).

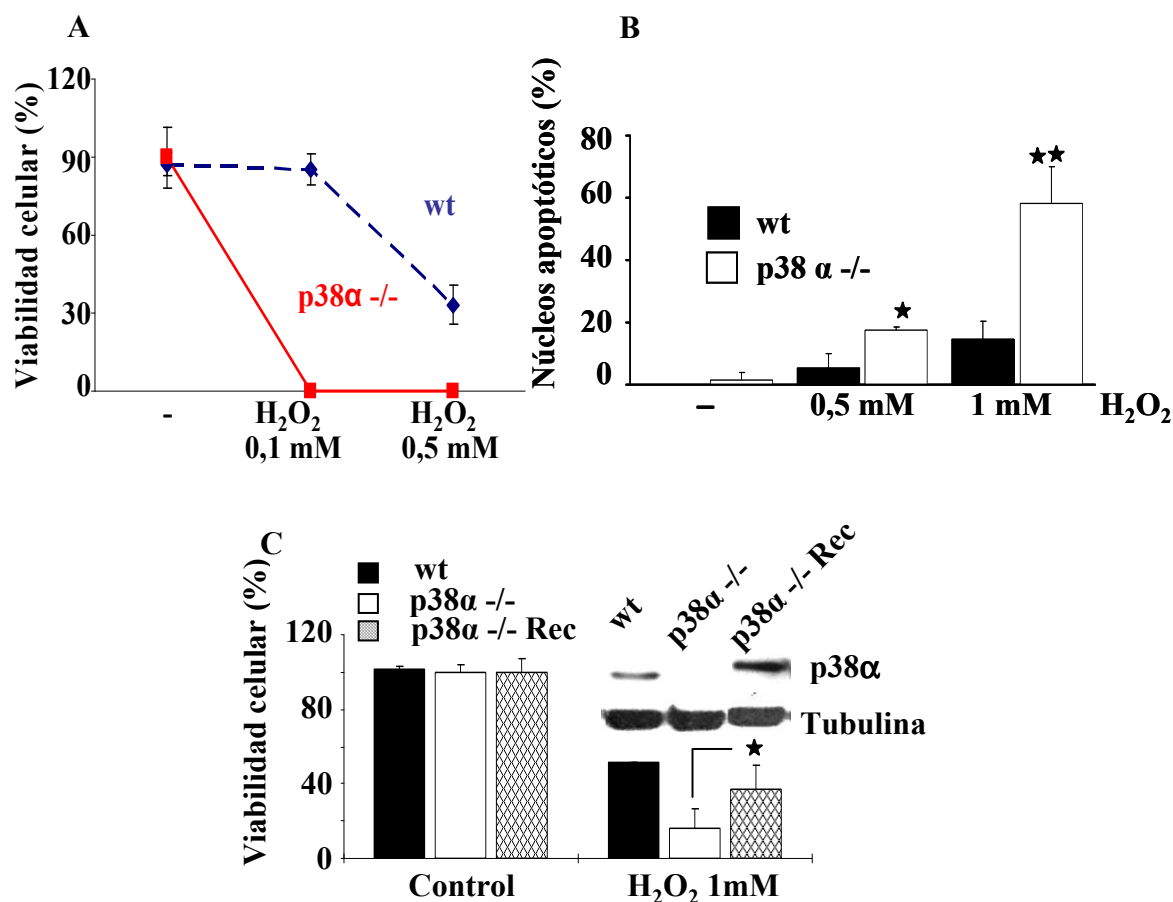
Por otro lado, en la sección anterior, habíamos demostrado que el H₂O₂ (1mM) disminuía la viabilidad celular en los fibroblastos que expresaban p38 α (wt) y en los deficientes en p38 α , pero sorprendentemente, en las células p38 α -/- la viabilidad era significativamente menor a partir de 6 horas. Sin embargo, a tiempos más cortos la viabilidad era mayor en los MEFs con p38 α (datos no publicados de nuestro grupo), especialmente al utilizar dosis bajas de H₂O₂ (0,1-0,5mM). Por ello, decidimos profundizar en los mecanismos moleculares responsables de la mayor sensibilidad a la muerte inducida por estrés oxidativo de las células deficientes en p38 α a tiempos largos para tratar de explicar el papel dual de p38 α en respuesta al estrés oxidativo.

3.1 p38 α MAPK induce supervivencia en respuesta al estrés oxidativo

Existen datos en la bibliografía a favor de un papel proapoptótico de las quinasas de estrés (p38, JNK) en respuesta al estrés oxidativo (Kyriakis y Avruch 2001; Dong et al. 2002). No obstante, actualmente se considera que la duración de la activación de estas quinasas, probablemente contribuya a la determinación del destino celular (Matsuzawa et al. 2002). Efectivamente, en nuestros MEFs el tratamiento con H₂O₂ a tiempos cortos (2-4h), inducía mayores tasas de muerte en los MEFs que presentan expresión de p38 α con respecto a los MEFs deficientes en dicha quinasa. Sin embargo, a tiempos más largos (dosis de H₂O₂ de 0,1-1 mM durante 8-24 horas) se producía mayor muerte en las células sin p38 α (Fig. 48A). A su vez, la tinción de núcleos con

yoduro de propidio indicó que se trataba de un proceso de apoptosis. De hecho, como se puede ver en la figura 48B, el número de núcleos condensados y/o fragmentados fue significativamente superior en las células deficientes en p38 α . Además, tal y como se puede observar en la figura 48C, la reconstitución de p38 α en las células p38 α -/- protegió de la muerte celular inducida por estrés oxidativo, alcanzando unos valores similares a los observados en las células de fenotipo silvestre. Por tanto, estos resultados demuestran que p38 α protege de la muerte celular inducida por estrés oxidativo.

Figura 48: p38 α MAPK induce supervivencia en respuesta a estrés oxidativo

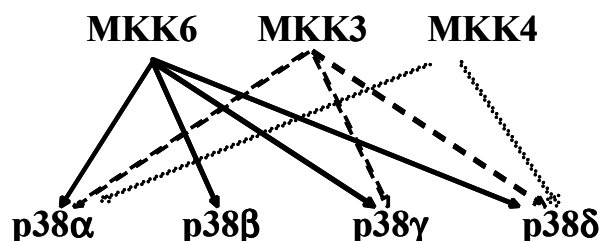


Los fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α -/-) fueron mantenidos en presencia de suero, tratados o no con H₂O₂, según se indica. A) Viabilidad celular. B) Apoptosis. El histograma representa el número de núcleos apoptóticos expresado como porcentaje respecto al control (wt). C) Efecto de la reconstitución de p38 α sobre la viabilidad celular. Como control del rescate de p38 α se muestran los niveles de p38 α analizados mediante Western-blot y normalizados con tubulina. (*p<0,05), (**p<0,01) versus control, (valor medio; n=3).

3.2 Papel de MKK3/6 en la muerte celular por estrés oxidativo

Para determinar la función de las quinasas activadoras de p38 (Fig. 49) más importantes (MKK6/3), analizamos la respuesta a la muerte celular inducida por el tratamiento con H_2O_2 en comparación a la ausencia de suero utilizando MEFs deficientes en MKK3 o MKK6 (Fig. 50). Como se puede observar en la figura 50A, todas las líneas celulares presentaron activación de p38 en respuesta al tratamiento con H_2O_2 , pero el grado de activación fue diferente dependiendo de la ausencia de MKK3 o MKK6.

Figura 49: Modelo de activación de las p38 MAPKs por sus quinasas activadoras



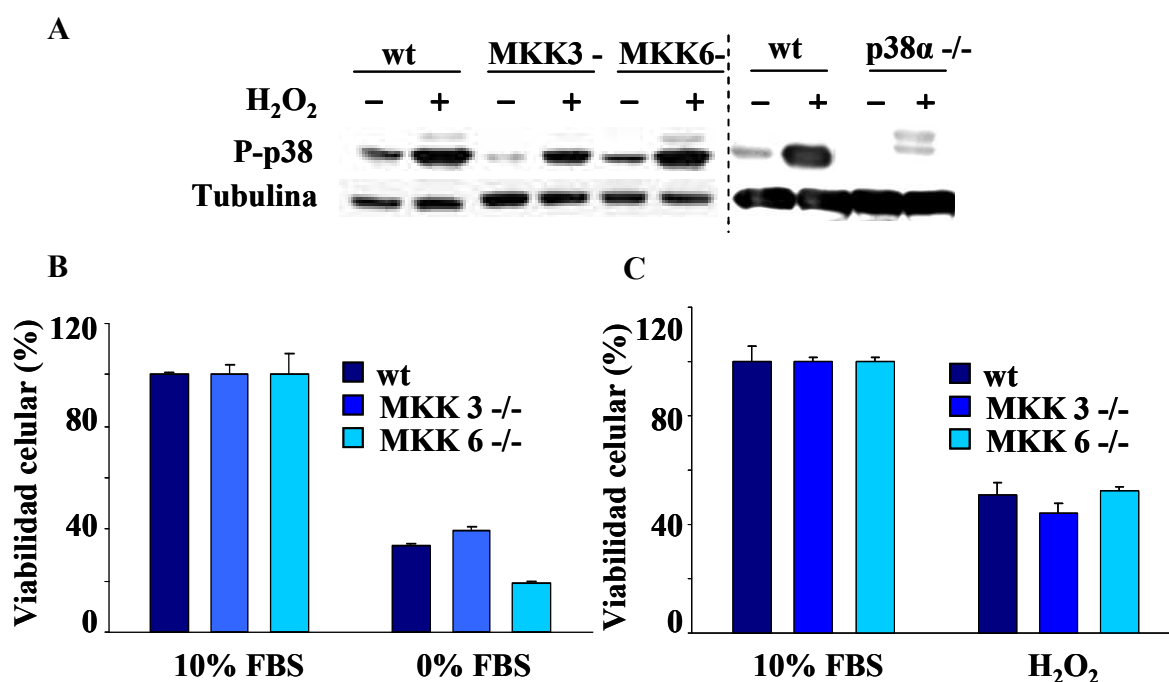
La cinética de activación y el nivel de activación de las isoformas de p38 MAPK varía en respuesta a diferentes estímulos, lo que sugiere que estas isoformas están específicamente reguladas a través de sus distintos activadores. De hecho, la MKK6 es capaz de fosforilar a las 4 isoformas, la MKK3 tiene una especificidad más restringida y sólo es capaz de fosforilar a la p38 α, γ y δ, mientras que la MKK4 sólo fosforila la p38α y la p38δ.

A su vez, por comparación con los MEFs p38α^{-/-}, parece que la isoforma que se activaba principalmente en las células deficientes en MKK6 o MKK3 era la p38α, aunque hay otra isoforma de mayor movilidad que se activaba ligeramente. Además, cabe señalar que en comparación con las células que expresan p38α (wt), el nivel de activación de p38α en los MEFs MKK6^{-/-} era ligeramente inferior, mientras que en las células deficientes en MKK3 era mucho menor, aunque en ningún caso se anulaba la activación de p38α por H_2O_2 (Fig. 50A).

Teniendo en cuenta el grado de activación de p38α en estas células en respuesta al H_2O_2 , se analizó su potencial papel en la muerte celular. Además, dado que la activación de p38α se correlaciona con los niveles de la muerte celular en condiciones

de ausencia de suero, se comparó el efecto de ambos estímulos proapoptóticos en estas células. Como podemos observar, en las líneas con mayor activación de p38 α (wt y MKK6 $-/-$) se produjo una mayor muerte celular en respuesta a la ausencia de suero (Fig. 50B), mientras que en las células MKK3 $-/-$, con menor activación de p38 α , se produjo menor muerte. Por el contrario, en respuesta al tratamiento con H₂O₂, aunque no se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de viabilidad, las células deficientes en MKK3 (con un nivel menor de activación de p38 α) presentaban una ligera disminución en la viabilidad celular en respuesta al H₂O₂. Esto sugiere, tal y como habíamos mostrado arriba (Fig. 49), que la p38 α mediaría supervivencia en respuesta al estrés oxidativo y que MKK3 sería más relevantes que MKK6 en esta ruta.

Figura 50: Papel de MKK3/6 en la muerte por estrés oxidativo

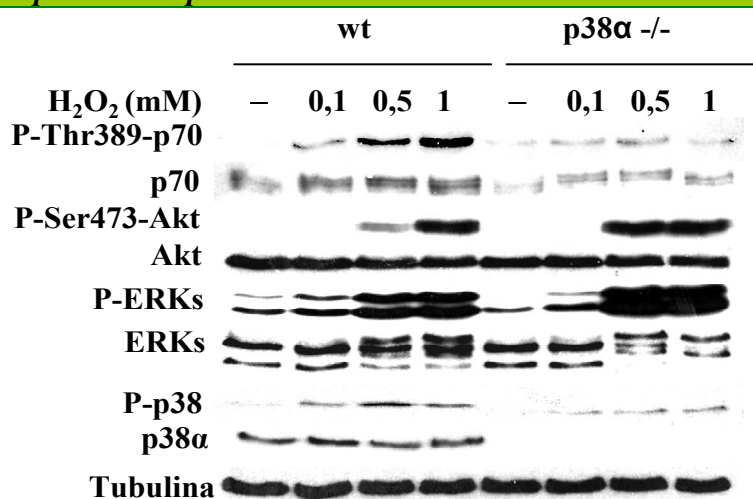


Los fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (wt), deficientes en MKK3, MKK6, o p38 α (p38 α $-/-$) fueron mantenidos en presencia o ausencia de suero, y tratados o no con H₂O₂, según se indica. A) Niveles de activación de p38 analizados mediante Western-blot y normalizados con tubulina. B) Viabilidad celular tras la retirada de suero durante 24 h. C) Viabilidad celular en respuesta al tratamiento con H₂O₂ 0,1 mM durante 24 h. El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas entre grupos. Se muestra experimento representativo (valores medios; n=3)

3.3 p38 α MAPK regula la activación de la ruta de supervivencia mTOR/p70S6K en respuesta al estrés oxidativo

Dado que el estrés oxidativo producía una alta mortalidad en las células deficientes en p38 α , decidimos analizar el nivel de activación de las principales rutas de supervivencia en respuesta al tratamiento con H₂O₂ a diferentes dosis. Como se puede observar en la figura 51, el H₂O₂ indujo la activación de la ruta de supervivencia de las ERKs en ambos tipos celulares, pero los niveles de fosforilación detectados fueron superiores en las células deficientes en p38 α , tal y como ocurre en respuesta a otros estímulos (Porras et al. 2004). Igualmente, la activación de Akt en respuesta al H₂O₂ era mayor en las células deficientes en p38 α , al igual que ocurre con otros estímulos (Zuluaga et al. 2007). Sin embargo, los niveles de fosforilación de p70S6K (Thr 389), no se correlacionaban con los mayores niveles de fosforilación de Akt en las células deficientes en p38 α . Así, a pesar de los altos niveles de fosforilación de Akt de las células deficientes en p38 α , la activación de p70S6K por mTOR era inferior al de las células de fenotipo silvestre. Este resultado indicaba que la p38 α está implicada en la activación de mTOR/p70S6K en respuesta al estrés oxidativo.

Figura 51: Diferencias en la activación de rutas de supervivencia dependiendo de la presencia de p38 α en respuesta al estrés oxidativo



Los fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α -/-) fueron mantenidos en presencia de suero y tratados con H₂O₂ (0, 0,1, 0,5 y 1 mM) durante 20 min, según se indica. Análisis mediante Western-blot de los niveles de P-p38, P-ERKs, P-Ser473-Akt y P-Thr389-p70S6K, así como de los niveles totales de estas proteínas, normalizados con tubulina.

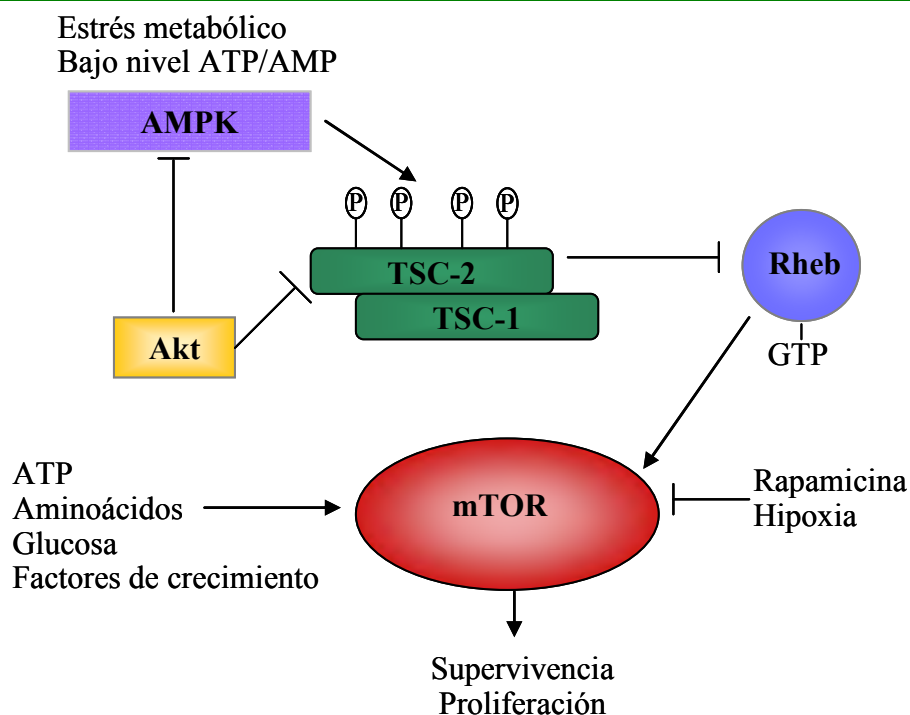
3.4 La activación de la ruta mTOR/p70S6K mediada por p38 α MAPK en respuesta al tratamiento con H₂O₂ no se correlaciona con la activación de Akt o de AMPK

Quisimos analizar si los niveles de activación de las proteínas que regulan la activación de mTOR/p70S6K, como Akt o AMPK, podrían estar implicadas en la diferente regulación en ausencia de p38 α , en respuesta al tratamiento con H₂O₂. Según nuestros resultados, la activación de Akt parecía estar desacoplada de mTOR/p70S6K en las células p38 α $-/-$, y esta podía ser una de las razones de la mayor sensibilidad a la muerte celular inducida por estrés oxidativo. Por otro lado, es conocido el efecto regulador negativo que tiene la AMPK sobre la ruta mTOR/p70S6K, como se ha indicado en la introducción. Esta quinasa es activada en condiciones de deficiencia de nutrientes y fosforila a TSC2 dando lugar a la inhibición de la ruta de mTOR (Fig. 52).

Como se puede ver en la figura 53, el tratamiento con H₂O₂ indujo un aumento en los niveles de fosforilación de AMPK (Thr172) y consecuentemente de su sustrato ACC (Ser79), que fueron significativamente superiores en las células que expresaban p38 α . Estos resultados indicaban que AMPK estaba más activa en las células de fenotipo silvestre, lo cual implicaría una mayor inhibición de ruta de mTOR/p70S6K por AMPK en estas células. Por tanto, esto no explicaría la mayor activación de mTOR/p70S6K que presentan las células con p38 α .

Por otro lado, también analizamos los niveles de fosforilación de TSC-2 (Ser 939) por Akt, la cual inactiva a TSC-2 (Fig. 52), y por lo tanto, al complejo TSC-2/TSC1, lo que daría lugar a la activación de mTORC1 (Fig. 52).

Figura 52: Ruta de activación de mTOR/p70S6K

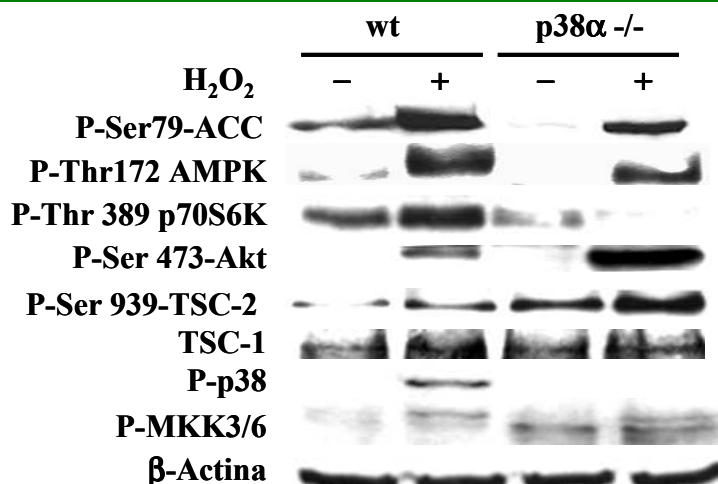


TSC-1/TSC-2, es activado por AMPK en condiciones de ausencia de aminoácidos o bajos niveles de ATP, activando su función como GAP de Rheb, lo cual, facilita la inactivación de Rheb e impide la activación de mTOR. Akt fosforila a TSC2 y a AMPK, inhibiendo la actividad de TSC-1/TSC-2 y AMPK, lo que da lugar a la activación de mTOR.

Como se puede observar en la figura 53, las células deficientes en p38 α presentaron altos niveles de P-TSC-2 en Ser939 (sitio fosforilado por Akt) en condiciones basales, correlativo con sus mayores niveles de Akt fosforilada. Además, aunque el tratamiento con H₂O₂ indujo un aumento en los niveles de P-TSC-2 (Ser 939), en ambas líneas celulares, este aumento fue muy superior en las células deficientes en p38 α . Este resultado está de acuerdo con los altos niveles de activación de Akt en respuesta a estrés oxidativo de las células p38 α -/-. Por el contrario, ambas líneas celulares presentaron los mismos niveles totales de TSC-1.

De acuerdo con estos resultados, la mayor activación de Akt presente en las células deficientes en p38 α en respuesta al tratamiento con H₂O₂ es totalmente efectiva en términos de fosforilación de TSC-2 en Ser 939, y debería reflejarse en una mayor activación de la ruta mTOR/p70S6K, pero curiosamente en estas células se activa mínimamente esta ruta en respuesta al tratamiento con H₂O₂.

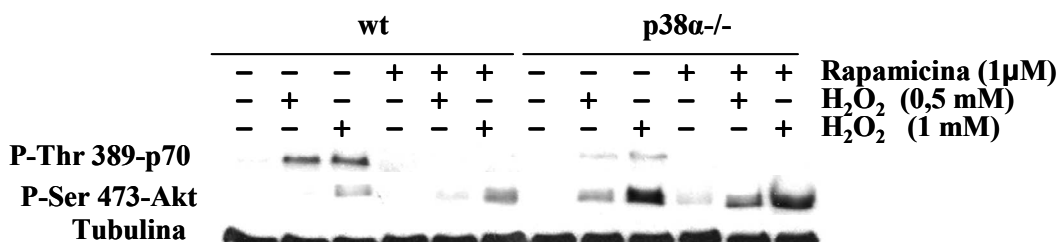
Figura 53: p38α media activación de la ruta de mTOR/p70S6K. Ausencia de acoplamiento con las actividades de Akt



Los fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38α (p38α -/-) fueron mantenidos en presencia de suero y se trataron o no con H₂O₂ 1mM durante 20 minutos, según se indica. Análisis mediante Western-blot de los niveles de P-p38, P-MKK3/6, TSC-1, P-Ser939-TSC-2, P-Ser473-Akt, P-Thr389-p70S6K, P-Thr172-AMPK y P-Ser79-ACC normalizados con β-actina.

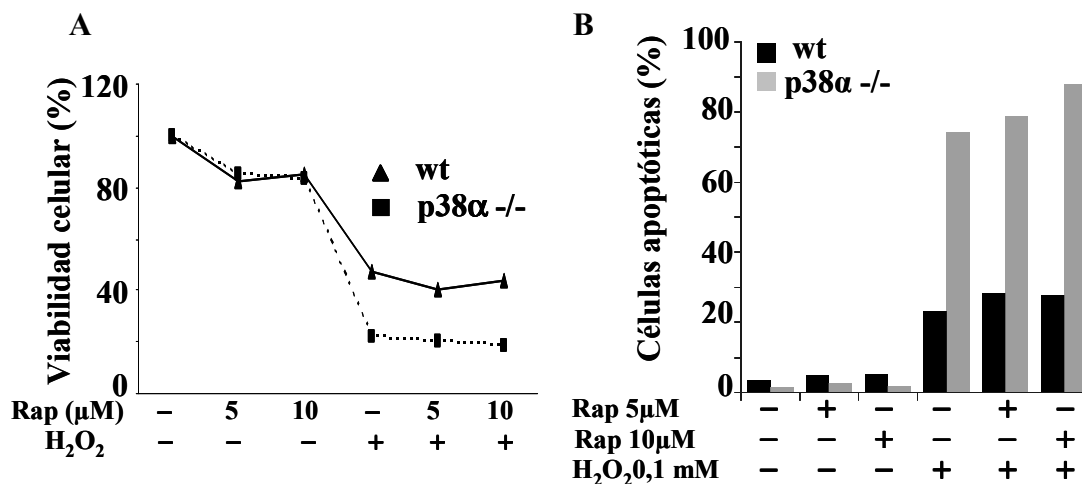
3.5 La rapamicina no sensibiliza a las células que expresan p38α a la muerte celular en respuesta al estrés oxidativo

La mayor activación de mTOR/p70S6K en las células que expresan p38α podía ser una de las posibles explicaciones a la mayor resistencia a la muerte celular inducida por estrés oxidativo en estas células respecto a las deficientes en p38α. En base a esta idea, decidimos inhibir la ruta de supervivencia mTOR/p70S6K con rapamicina para evaluar su efecto sobre la viabilidad celular. Previamente, evaluamos el grado de inhibición a tiempos cortos. Tal y como se puede ver, el tratamiento con rapamicina inhibió completamente la fosforilación de p70S6K por mTOR en respuesta a las dosis utilizadas (Fig. 54).

Figura 54: Efecto de la rapamicina sobre la activación de p70S6K

Los fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38α (p38α^{-/-}) fueron mantenidos en presencia de suero y tratados o no con H₂O₂ durante 20 minutos y/o rapamicina a diferentes dosis, según se indica. Análisis mediante Western-blot de los niveles de P-Ser 473-Akt y P-Thr 389-p70S6K normalizados con tubulina.

Como se puede ver en la figura 55, el tratamiento con rapamicina no produjo ningún incremento significativo en la muerte celular inducida por H₂O₂ ni en las células que expresaban p38α, ni en las deficientes.

Figura 55: Efecto de la rapamicina sobre la muerte celular inducida por estrés oxidativo

Los fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38α (p38α^{-/-}) fueron mantenidos en presencia de suero y tratados o no con H₂O₂ 0,1mM y/o rapamicina a diferentes dosis durante 24h, según se indica. A) Análisis de la viabilidad celular. B) Porcentaje de células apoptóticas obtenido mediante análisis del ciclo celular por citometría de flujo. En ambos casos se muestran experimentos representativos.

Este resultado parecía indicar, que la menor activación de mTOR/p70S6K no era responsable de la mayor sensibilidad de las células deficientes en p38α a la muerte

celular por estrés oxidativo. No obstante, se puede observar en la figura 55A, que el tratamiento exclusivo con rapamicina sí produjo un descenso en la viabilidad basal en ambas líneas celulares. Probablemente, este descenso era debido a una parada de crecimiento, ya que no se detectó ningún incremento en el porcentaje de apoptosis cuantificada por citometría de flujo (Fig. 55B).

3.6 p38 α MAPK protege frente a la muerte inducida por H₂O₂ mediante la expresión de proteínas de defensa frente al estrés oxidativo

Dado que la inhibición de mTOR/p70S6K con rapamicina no incrementaba la sensibilidad de las células de fenotipo silvestre a la muerte células inducida por H₂O₂, analizamos otros mecanismos capaces de explicar el efecto que estábamos observando.

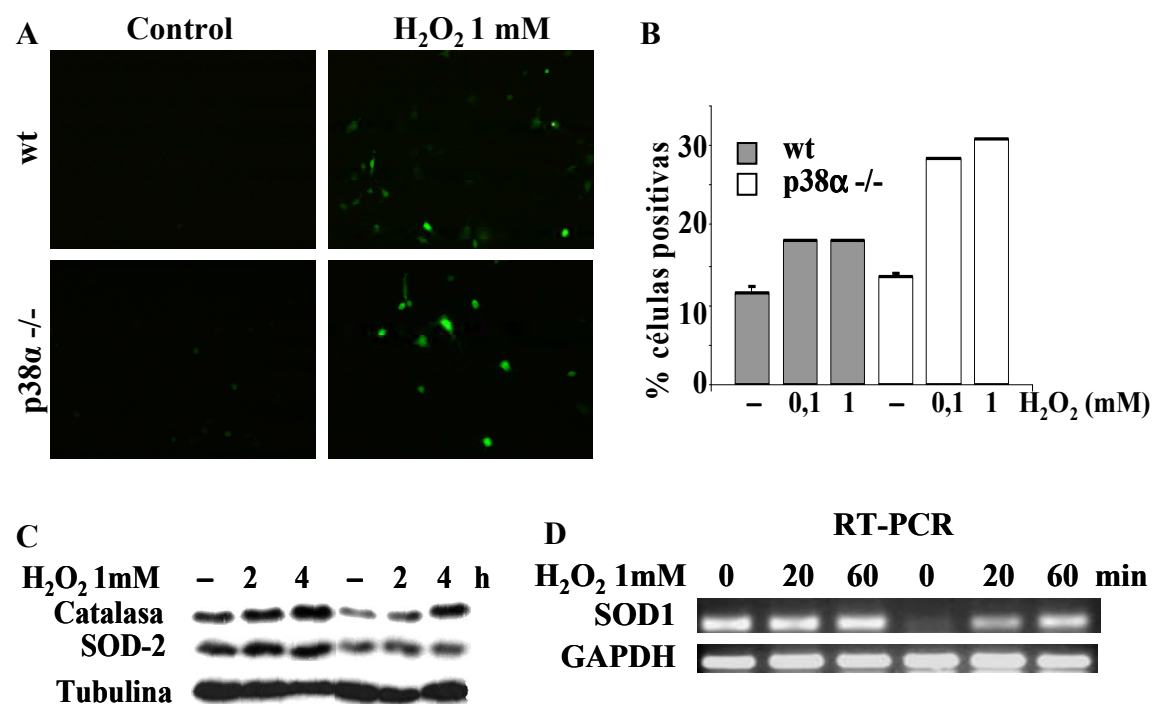
El principal efecto del tratamiento con H₂O₂ es el incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares, produciendo así estrés oxidativo. Las ROS han sido consideradas tradicionalmente como subproductos tóxicos producidos por el metabolismo celular, pero actualmente existen numerosos datos que indican que los ROS están activamente involucrados en la regulación de rutas de transducción de señales (Hancock et al. 2001) y diversos procesos celulares.

Por otro lado, como ya hemos comentado en la introducción, la p38 α MAPK desempeña un papel importante en la coordinación de la respuesta celular a multitud de estímulos de estrés, incluidas las ROS. La respuesta celular va a depender, entre otras cosas, de las características del estímulo. Por ejemplo, se sabe que la intensidad y la duración de la exposición al estrés oxidativo es importante para determinar el destino celular (Matsuzawa y Ichijo 2008). Normalmente, se considera que exposiciones largas dan lugar a apoptosis, mientras que exposiciones cortas o transitorias median supervivencia o diferenciación celular (Matsuzawa y Ichijo 2008).

Aunque p38 α no es un inhibidor general de la señalización tumoral, modula la transformación oncogénica inducida por oncogenes que producen ROS como Ras (Dolado et al. 2007). p38 α es activado por las ROS en los procesos tempranos de transformación tumoral induciendo apoptosis y previniendo así la acumulación de ROS y de sus efectos carcinogénicos (Dolado et al. 2007). Nuestros datos previos corroboraban esto, dado que los tratamientos a tiempos muy cortos inducían una alta tasa de muerte celular por apoptosis en las células que expresaban p38 α (datos no publicados del grupo). Sin embargo, los resultados mostrados aquí indican que el

incremento de la apoptosis inducido por estrés oxidativo es más drástico en las células deficientes en p38 α . Por tanto, de alguna manera, las células de fenotipo silvestre conseguían mantener la viabilidad a tiempos más largos. Datos de la literatura indicaban que la expresión del oncogén H-RasV12 incrementaba los niveles de ROS, tanto en MEFs wt como en p38 α $-/-$, pero se producía una acumulación significativa de ROS exclusivamente en las células p38 α $-/-$ (Dolado et al. 2007). Por ello, analizamos el contenido de ROS en los MEFs tras el tratamiento con H₂O₂ y vimos, que aunque los niveles de ROS eran muy similares en ambas líneas celulares a nivel basal, estos niveles aumentaban mucho en las células deficientes en p38 α tratadas con H₂O₂ (Fig. 56). Sin embargo, como se puede observar en la figura 56B no existen diferencias significativas en dichos niveles entre las dos dosis empleadas.

Figura 56: p38 α induce la expresión de enzimas de defensa frente al estrés oxidativo



Los fibroblastos embrionarios de ratón de fenotipo silvestre (wt) o deficientes en p38 α (p38 α $-/-$) fueron mantenidos sin (A) o con (B, C y D) suero y tratados con distintas dosis de H₂O₂ y a diferentes tiempos, según se indica. A y B) Determinación de los niveles de ROS mediante incubación con DCFH durante 15 min. A) Análisis de los niveles de ROS mediante inmunofluorescencia B) Porcentaje de células positivas para DCFH analizadas por citometría de flujo. C) Análisis de los niveles de SOD-2 y catalasa mediante Western-blot normalizado con tubulina. D) Análisis de los niveles de expresión del RNAm de SOD-1 mediante RT-PCR normalizado con GAPDH.

Los altos niveles de ROS alcanzados por las células deficientes en p38 α nos hicieron pensar que quizás estas células, presentaban diferentes deficiencias en la protección frente al estrés oxidativo. Efectivamente, tal y como se puede ver en la figura 56C y 56D, las células deficientes en p38 α presentaban menores niveles de las proteínas protectoras frente al estrés oxidativo, SOD-2 y catalasa, en condiciones basales. Además estas células no eran capaces de inducir la expresión de estas proteínas antioxidantes hasta al menos 4 horas después del tratamiento con H₂O₂, en el caso de la catalasa, o ni siquiera a este tiempo en el caso de SOD-2 (Fig. 56C). Por otro lado, los niveles de expresión del RNAm de SOD-1 eran también mucho más bajos en condiciones basales en las células deficientes en p38 α , y el tratamiento con H₂O₂ inducía una menor expresión del RNAm a 20 y 60 minutos, por lo que la expresión del RNAm de SOD-1 era siempre inferior en las células deficientes en p38 α .

En base a todos estos resultados, pensamos que los bajos niveles de enzimas protectoras frente al estrés oxidativo, podrían ser quizá responsables de la mayor sensibilidad de las células deficientes en p38 α a la muerte celular inducida por estrés oxidativo.

Discusión

1. p38 α MAPK REGULA POSITIVA O NEGATIVAMENTE LA ACTIVIDAD DE Rac-1 DEPENDIENDO DE LA PRESENCIA DE SUERO

Nuestros resultados apoyan la existencia de una conexión entre las rutas de señalización de p38 α MAPK y Rac-1 en líneas derivadas de cardiomiocitos, donde p38 α parece jugar un papel dual dependiendo de la presencia de suero. De esta manera, en ausencia de suero, p38 α mediaría la formación de un complejo entre caveolina-1 y Rac-1, que da lugar a un aumento en la actividad de Rac-1. La formación de este complejo requiere la adhesión de las células a un sustrato, ya que se produce por un mecanismo dependiente de la activación de integrinas y/o cadherinas, dado que dicho complejo se forma en ausencia de suero y, por lo tanto, de factores de crecimiento. Por el contrario, cuando las células están en presencia de factores de crecimiento (por ejemplo, suero), p38 α regula negativamente la actividad de Rac-1. En estas condiciones, la interacción entre caveolina-1 y Rac-1 disminuye mucho y es independiente de p38 α . Curiosamente, los niveles de Rac-1-GTP están incrementados en los cardiomiocitos deficientes en p38 α incubados en presencia de suero, lo que, probablemente, explica su mayor adhesión. De hecho, la expresión de un mutante dominante negativo de Rac-1 bloquea este aumento de adhesión en las células carentes de p38 α .

La abundancia de proteínas implicadas en señalización celular en las caveolas indica que éstas podrían servir como plataformas donde se procesan diversas señales extracelulares (Anderson 1993; revisado por Salanueva et al. 2007). El papel de la caveolina-1, como elemento estructural de las caveolas, sería el de promover el reclutamiento y estabilizar a las proteínas y lípidos que forman las caveolas, los cuales, formarían dominios estables y actuarían como plataformas de transducción de señales. Existen numerosos datos tanto sobre la activación como sobre la inhibición de rutas de transducción de señales a nivel de las caveolas (revisado por Okamoto et al. 1998; y Salanueva et al. 2009). Un factor común a todos estos eventos es que la interacción entre los receptores activados y sus inmediatos efectores se produce en las balsas lipídicas (“lipid rafts”) y son inhibidos por la depleción del colesterol (revisado por Salanueva et al. 2009). A su vez, la formación de estos dominios y su dinámica estaría finamente regulada por componentes celulares que incluyen al citoesqueleto de actina, así como proteínas implicadas en señalización celular y estructurales (Lajoie et al. 2009).

Por otro lado, está bastante establecido que la activación de las integrinas induce la unión de Rac-1-GTP a regiones de la membrana ricas en colesterol (Del Pozo 2004a; Cho et al. 2004). Consecuentemente, la desorganización de estas regiones ricas en colesterol, bien por la depleción del colesterol o por la pérdida de adhesión, disminuye la unión de Rac-1 a estas zonas de la membrana, conduciendo a la internalización e inactivación de Rac-1 (del Pozo et al. 2004b). En nuestro modelo celular, estos tratamientos efectivamente produjeron rotura de los complejos caveolina-1-Rac-1 en cardiomiocitos de fenotipo silvestre mantenidos en ausencia de suero, lo cual, apoyaría la idea de que la activación de las integrinas podría ser responsable de la formación de este complejo.

La familia de las integrinas en mamíferos está formada por un gran número de receptores de adhesión celular, basados en la asociación de diferentes subunidades β con distintas subunidades α (Johnson et al. 2009). Por ello, es muy difícil establecer el papel preciso jugado por las integrinas en este caso, dado que sería necesario bloquear muchas posibles combinaciones de cadenas α y β . Sin embargo, el hecho de que la adhesión de los cardiomiocitos al colágeno, modifique la actividad de Rac-1 bajo condiciones de ausencia de suero, sugiere un mecanismo dependiente de integrinas. Por otra parte, el efecto de la confluencia celular, tanto en la interacción caveolina-1-Rac-1 como en la actividad de Rac-1 en presencia de suero, apoya la importancia de las uniones célula-célula, además de las interacciones célula-matriz en este mecanismo.

p38 α parece regular la interacción entre caveolina-1 y Rac-1, fundamentalmente en la membrana, a través de la regulación de la organización del citoesqueleto de actina. Esto estaría de acuerdo con datos previos que indicaban que p38 α era capaz de regular la reorganización del citoesqueleto de actina dando lugar a la formación de fibras de estrés de F-actina a través de la cascada PAK1-2/MKK3-6/p38 α /MK-2/Hsp-27 (Rousseau et al. 2006). Así, en nuestro modelo, p38 α induce la formación de fibras de estrés en los cardiomiocitos de fenotipo silvestre mantenidos en ausencia de suero, mientras que en las células deficientes en p38 α dichas fibras no se forman y el citoesqueleto de actina está desorganizado. Esta desorganización del citoesqueleto de actina podría ser responsable de la internalización de la caveolina-1 observada en los cardiomiocitos carentes de p38 α mantenidos en ausencia de suero, ya que, el tratamiento con citocalasina D de los cardiomiocitos que expresan p38 α mantenidos sin suero inducía la internalización de la caveolina-1, e incluso bloqueaba la interacción

entre caveolina-1 y Rac-1. Estos resultados, concuerdan con otros datos que indican que los filamentos de actina regulan la localización de componentes de señalización celular en las caveolas, tales como la adenilato ciclasa en cardiomiocitos (Head et al. 2006). Esto significa, que es necesaria una correcta organización del citoesqueleto y de las caveolas para que las células puedan activar las rutas de transducción de señales. En nuestro caso, la activación de integrinas a través de p38 α jugaría un papel importante en dicha regulación y en la activación de Rac-1 en ausencia de suero.

Por otro lado, la GTPasa de bajo peso molecular Rho, también podría estar involucrada en la formación del complejo caveolina-1-Rac-1 inducida por p38 α en condiciones de ausencia de suero a través de la reorganización del citoesqueleto de actina. De hecho, aunque la actividad de Rho es similar en cardiomiocitos de fenotipo silvestre y en los deficientes en p38 α , la inhibición de la quinasa activada por Rho, ROCK, impedía la interacción entre caveolina-1 y Rac-1 e inducía una desorganización del citoesqueleto de actina (datos no publicados de nuestro laboratorio).

La interacción entre integrinas y factores de crecimiento es esencial para regular diferentes funciones celulares en células que crecen adheridas a un sustrato. De acuerdo con esto, la regulación de Rac-1 por integrinas y/o cadherinas podría ser modificada por los factores de crecimiento cuando las células se encuentran en presencia de suero. (Mertens et al. 2003; Welch et al. 2003; Patel et al. 2007). Por ejemplo, el suero activa las rutas de PI3K/Akt y ERKs, pero esta activación es atenuada por p38 α en los cardiomiocitos de fenotipo silvestre. De hecho, tanto la actividad de Akt como la de las ERKs, es significativamente superior en las células deficientes en p38 α (Porras et al. 2004; Zuluaga et al. 2007). Es posible que estas u otras rutas de señalización puedan regular la ruta de activación de Rac-1 inducida por integrinas. Por otro lado, hay que tener en cuenta que en presencia de suero, la confluencia celular juega un papel importante. De hecho, en esas condiciones, la activación de Rac-1 era muy baja en las células que expresan p38 α . En este sentido, hay que tener en cuenta que la p38 α se activa por los contactos célula-célula en condiciones de confluencia induciendo parada de ciclo (Swat et al. 2009; Faust et al. 2005). Esta activación de p38 α en células confluentes se ha visto que induce la degradación del receptor de EGF a través de un mecanismo dependiente de la disminución de los niveles de Sprouty2, también dependiente de degradación (Swat et al. 2009). Como consecuencia, hay una menor activación de la señalización a través del receptor de EGF en MEFs que expresan p38 α

respecto a los deficientes en dicha quinasa. Esto podría quizá también explicar la mayor activación de Rac-1 en cardiomiocitos deficientes en p38 α mantenidos con suero y, por lo tanto, en presencia de distintos factores de crecimiento como el EGF.

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, es posible que esta activación diferencial de distintas rutas (tanto la del EGF como de otras), en presencia o ausencia de p38 α , pueda explicar la regulación positiva de la actividad de Rac-1 detectada en cardiomiocitos p38 α -/- mantenidos con suero en confluencia, dado que tanto la organización de la actina como la distribución de la caveolina-1 es similar en ambos tipos celulares (con y sin p38 α). De hecho, la caveolina-1 está internalizada en ambos casos y como consecuencia, las interacciones entre caveolina-1 y Rac-1 son muy bajas. Otra posible explicación a los altos niveles de activación de Rac-1 presentes en los cardiomiocitos p38 α -/- en presencia de suero, sería que Rac-1 podría anclarse a la membrana a través de grupos geranilgeranilo y de esta manera su activación no podría ser regulada por p38 α a través de la organización del citoesqueleto de actina y de la interacción con caveolina-1, sino por otras rutas de transducción de señales que actúen por encima de Rac-1.

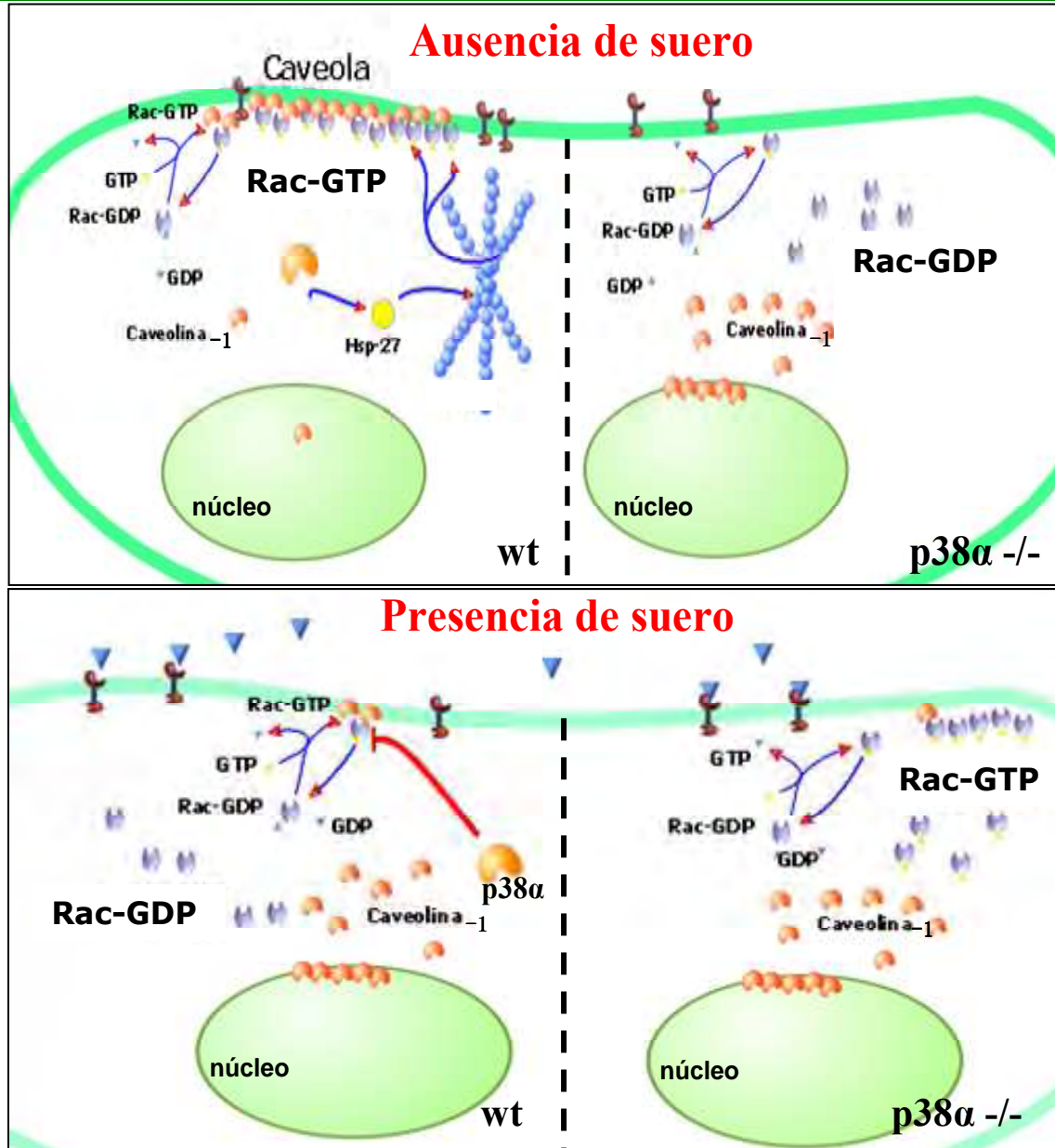
Estudios recientes han demostrado que la activación de Rac-1 por integrinas y por factores de crecimiento no es idéntica. Así, en ausencia de señalización por integrinas, PAK-1 no es activado por Rac-1-GTP (Grande-García y del Pozo 2008). Por tanto, aunque Rac-1 se active por los factores de crecimiento, es incapaz de activar a su principal efector PAK-1, dado que esta activación sólo se produciría en las caveolas, en dónde tendría lugar la interacción Rac-1-PAK (Grande-García y del Pozo 2008).

El incremento de la actividad de Rac-1 observado en los cardiomiocitos deficientes en p38 α mantenidos con suero, parece mediar adhesión celular, ya que, cuando expresamos el mutante de Rac-1, disminuye mucho esta adhesión. Esto estaría de acuerdo con datos previos de la bibliografía que indican que Rac-1 regula la adhesión a través de la regulación del citoesqueleto de actina (Guo et al. 2006). Teniendo en cuenta la implicación de p38 α y Rac-1 en la regulación de la adhesión, y las interacciones entre la ruta de p38 α y Rac-1 que hemos descrito aquí, es posible que ambas proteínas actúen en la misma ruta regulando la adhesión. Así, en presencia de factores de crecimiento, Rac-1 modularía la adhesión celular, mientras que p38 α estaría inhibiéndola, muy probablemente a través de la regulación negativa de Rac-1.

En resumen, nuestros resultados indican que p38 α puede regular diferencialmente la actividad de Rac-1, dependiendo de la presencia o ausencia de suero. En condiciones de ausencia de suero, p38 α promueve la organización del citoesqueleto de actina facilitando la interacción entre caveolina-1 y Rac-1, así como la activación de Rac-1. Por otro lado, p38 α regula negativamente la actividad de Rac-1 en presencia de suero, probablemente de manera indirecta, a través de la regulación de otras rutas de señalización. Estas observaciones podrían ser potencialmente relevantes en nuestro modelo celular, para el estudio de la función cardíaca, debido a la similitud existente entre la ausencia de suero y la isquemia (la cual, implica ausencia de factores tróficos, metabolitos y oxígeno). La implicación de p38 α en el mecanismo de muerte de cardiomiocitos inducido por isquemia-reperfusión (Otsu et al. 2003; Shiroto et al. 2005) y la mayor actividad de Rac-1 mediada por p38 α bajo condiciones de ausencia de suero, sugiere que Rac-1 podría jugar un papel relevante en la isquemia.

En otros modelos celulares, estos resultados podrían ser relevantes en la comprensión de mecanismos básicos de regulación celular. Existen numerosos estudios que sugieren que muchas rutas de transducción de señales son altamente dependientes de integrinas y de una correcta organización de dominios lipídicos, tales como Ras/ERK, JNK, PI3K/Akt, Src y FAK (del Pozo et al. 2005). Estas rutas están implicadas en la regulación del ciclo celular, del balance supervivencia/apoptosis, así como del crecimiento independiente de sustrato, entre otras funciones. Por otra parte, la inhibición de la internalización de dominios de membrana activados por integrinas o la utilización de rutas alternativas que no requieran activación de integrinas, serían eventos de importancia fundamental para el crecimiento independiente de sustrato mostrado por las células tumorales (del Pozo et al. 2005).

Figura 57: Regulación opuesta de Rac-1 por p38α MAPK en ausencia o presencia de suero



A) Regulación de Rac-1 por p38α en ausencia de suero. Panel izquierdo, en los cardiomiocitos de fenotipo salvaje (wt) p38α media la formación de los complejos caveolina-1/Rac-1 y la activación de Rac-1 a través de un mecanismo dependiente de adhesión celular y de la formación de fibras de estrés por parte del citoesqueleto de actina. Esta formación de fibras de estrés podría estar mediada por MK-2/Hsp27 o por otras proteínas reguladas por p38α. Panel derecho, en los cardiomiocitos deficientes en p38α (p38α^{-/-}) el citoesqueleto de actina está desorganizado, lo que impide la formación de complejos caveolina-1/Rac-1 y la activación de Rac-1. **B) Regulación de Rac-1 por p38α en presencia de suero.** En presencia de suero, el citoesqueleto de actina no forma fibras de estrés, por lo que apenas existen complejos entre caveolina-1 y Rac-1, ni en células fenotipo salvaje (wt) ni en las deficientes en p38α (p38α^{-/-}). La activación de Rac-1 es mayor en cardiomiocitos deficientes en p38α, lo cual, da lugar a un aumento en la adhesión celular.

2. C3G REGULA NEGATIVAMENTE A p38 α MAPK EN RESPUESTA A ESTRÉS POR UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE Rap-1: PAPEL EN LA MUERTE CELULAR

p38 α desempeña un importante papel como mediador de la apoptosis en respuesta a diferentes estímulos proapoptóticos y en diferentes modelos celulares (revisado por Nebreda y Porras 2000; Rincon 2001; Porras et al. 2004). También, se ha demostrado que p38 α funciona como un supresor de tumores en la transformación inducida por el oncogén H-Ras (Dolado et al. 2007), debido a su capacidad de inducir apoptosis en respuesta a las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas. Sin embargo, nosotros presentamos evidencias que apoyan una función de supervivencia para p38 α en MEFs, cuando son estimulados con H₂O₂. Además, el silenciamiento de C3G, a través del aumento de la actividad de p38 α , incrementa dicha supervivencia.

Por el contrario, en respuesta a la ausencia de suero, el silenciamiento de C3G induce apoptosis en los MEFs, nuevamente a través del incremento de la actividad de p38 α . Esto está de acuerdo con el papel proapoptótico de p38 α en respuesta a la ausencia de suero que nuestro grupo había descrito previamente (Porras et al. 2004; Zuluaga et al. 2007). A su vez, nuestros datos indican que C3G puede mediar muerte celular o supervivencia en los MEFs dependiendo del estímulo, y este efecto lo realiza a través de la regulación negativa de la actividad de p38 α MAPK. Este efecto es independiente de su actividad como GEF sobre Rap-1, el cual, de hecho, juega un papel opuesto a C3G en nuestro modelo celular. Por tanto, nuestros datos revelan un importante papel de C3G como modulador de la muerte celular a través de la regulación de p38 α . Por otro lado, Rap-1 tiene una función opuesta a C3G sobre la muerte celular, pero dicha función también está mediada por p38 α , la cual, es regulada positivamente por Rap-1.

En la presente memoria describimos un papel dual para C3G como regulador de la muerte celular en MEFs. C3G estaría actuando como una molécula pro y anti-apoptótica dependiendo del tipo de estímulo. Este papel dual ejercido por C3G que nosotros proponemos está de acuerdo con los resultados de otros autores, que muestran que la sobreexpresión de C3G induce apoptosis en células hematopoyéticas (Shivakrupa et al. 2003), mientras que C3G media supervivencia en líneas celulares de neuroblastoma mantenidas sin suero (Radha et al. 2008). Además, estos datos

concuerdan con los datos obtenidos en la línea celular de leucemia mieloide crónica K562 (Maia et al. 2009). En estas células, hemos demostrado recientemente en colaboración con el grupo de la Dra. Guerrero que la sobreexpresión de C3G incrementa los niveles de apoptosis, tanto basal como en respuesta al tratamiento con el agente antitumoral, STI-571 (que es un inhibidor de Abl). Curiosamente, el silenciamiento de C3G también incrementa los niveles de apoptosis en respuesta a STI-571, y ambos efectos están mediados por p38 α . Sin embargo, en contra de nuestros resultados en MEFs, Rap-1 media el efecto de C3G sobre la apoptosis en las células K562. Por tanto, en base a todos estos datos, existe una interacción entre las rutas de C3G y p38 α que estaría regulando la muerte celular, al menos, en estos dos modelos celulares. Sin embargo, dependiendo del tipo celular, Rap-1 puede actuar como mediador de C3G o ejercer un papel opuesto, pero también a través de la regulación de p38 α . A su vez, dependiendo del tipo de estímulo, los efectos de C3G también son diferentes.

Las diferencias en la cascada de C3G/p38 α que se observan entre los MEFs y la línea K562, puede ser debida a diferencias entre estas dos líneas y/o al tipo de estímulo. La línea celular K562 deriva de un tumor con un amplio número de alteraciones, entre las que destaca, la sobreexpresión de una isoforma truncada de C3G de 87 KDa, la cual es fosforilada por la proteína oncogénica Bcr-Abl, que está presente en estas células (Gutierrez-Berzal et al. 2006). Además, esta activación constitutiva de Bcr-Abl contribuye a la activación de vías de supervivencia y proliferación. Por tanto, es posible que C3G (tanto la isoforma larga no truncada, como la truncada) pueda estar actuando como un oncogén en las células K562 bajo determinadas circunstancias. Estas diferencias comentadas, junto con otras, como la capacidad de crecer en suspensión (como todas las células hematopoyéticas) podrían explicar las diferentes acciones de C3G y/o Rap-1 sobre la muerte celular.

Otro dato interesante, es por qué Rap-1 no siempre media el efecto de C3G sobre p38 α MAPK. Existen diferentes razones que podrían explicarlo. Por un lado, se sabe que C3G puede actuar a través de mecanismos independientes de Rap-1, lo cual, fue demostrado utilizando construcciones mutantes de C3G carentes del dominio catalítico con actividad GEF (Shivakrupa et al. 2003; Guerrero et al. 2004; Martin-Encabo et al. 2007). Además, existen otros GEFs capaces de activar a Rap-1, alternativos a C3G. Estos GEFs podrían ser diferencialmente activados por distintas señales, e incluso, podrían tener diferentes patrones de expresión dependiendo del tipo celular (Hattori y

Matsuda 1997; Hattori y Minato 2003; Stork 2005; Kraemer et al. 2001). Esto también podría explicar las discrepancias surgidas en las interrelaciones descritas para p38 MAPK y Rap-1. Por un lado, Rap-1 inhibe la activación de p38MAPK inducida por Ras en líneas celulares procedentes de Timoma (Stork 2005; Palsson et al. 2000), mientras que media en la activación de p38 MAPK inducida por FGF2 en células endoteliales (McDermott y O'Neill 2002), tal y como hemos observado nosotros en los MEFs estimulados con H₂O₂.

La búsqueda de potenciales mecanismos involucrados en la regulación de la muerte celular por C3G y/o Rap-1 a través de la regulación de p38 α , nos llevó a analizar los niveles de proteínas pro y antiapoptóticas de la familia de Bcl-2. Nuestros datos sugieren que la relación Bim/Bcl-x_L podría jugar un papel importante tanto en respuesta a la ausencia de suero como al estrés oxidativo. En ausencia de suero, este cociente Bim/Bcl-x_L es muy elevado en las células que expresan p38 α y aumenta aún más al silenciar C3G en paralelo al aumento en los niveles de apoptosis. Por el contrario, aunque en las células que expresan el mutante dominante negativo de Rap-1 este cociente era relativamente alto en condiciones basales (sin que se detectase una apoptosis significativa), disminuía significativamente tras la retirada de suero, lo cual, se correlacionaba con unos bajos niveles de apoptosis (ver figura 46C).

El cociente Bim/Bcl-x_L también parece explicar la muerte celular en respuesta a estrés oxidativo, pero en estas condiciones, parece que los niveles de BNIP-3 también podrían ser relevantes en la regulación de la muerte celular de los MEFs. Así por ejemplo, los altos niveles de BNIP-3 de los MEFs de fenotipo silvestre con silenciamiento de C3G podrían explicar la mayor supervivencia observada en estas células. Sin embargo, la explicación a todos los cambios detectados en los niveles de Bim bajo las diferentes condiciones no parece sencilla, dado que los cambios en los niveles de Bim pueden ser el resultado tanto de la expresión como de la degradación de esta proteína. De hecho, p38MAPK puede incrementar la transcripción de Bim en respuesta al tratamiento con arsenito (Cai y Xia 2008), lo que podría explicar el incremento en los niveles de Bim observados en las células de fenotipo silvestre con silenciamiento de C3G, pero no sería capaz de explicar los cambios en otras condiciones. Así, los cambios en la estabilidad y degradación de Bim podrían jugar un papel y podrían ser una consecuencia de su fosforilación (Hubner et al. 2008). En este sentido, se sabe que Bim puede ser fosforilado en diferentes residuos, dando lugar a su

estabilización o degradación dependiendo del residuo fosforilado (Hubner et al. 2008). Por tanto, en nuestras condiciones experimentales, el diferente balance de activación de p38 MAPK, ERKs y otras quinasas, que pueden fosforilar a Bim en diferentes residuos (Hubner et al. 2008), podría ser importante en la regulación de la estabilidad de Bim, dado que hemos observado cambios en la movilidad de esta proteína en los diferentes Western-blot (ver figura 46). No obstante, teniendo en cuenta que se pueden activar diferentes quinasas en las diferentes condiciones de trabajo, no es fácil explicar de manera sencilla todos los cambios observados en los niveles de Bim.

Otro punto importante, sería el referente a los cambios en los niveles de Bcl-x_L, los cuales, podrían ser el resultado del balance entre la expresión y la degradación de esta proteína. Así, cabe señalar que Bcl-x_L disminuye de forma muy importante en respuesta al H₂O₂ en las células que expresan el mutante dominante negativo de Rap-1, mientras que en las células de fenotipo salvaje con silenciamiento de C3G, los niveles de Bcl-x_L aumentan y sólo disminuyen ligeramente a las 4h del tratamiento. Por tanto, quizá una mayor degradación de Bcl-x_L podría explicar su disminución en respuesta al tratamiento con H₂O₂ en las células que expresan el mutante dominante negativo de Rap-1.

Además de los cambios en la relación Bim/Bcl-x_L, existen otras proteínas proapoptóticas como Bax, que tienen una menor expresión en los MEFs deficientes en p38α, que podrían contribuir a las diferencias observadas en la muerte celular regulada por p38α, tal y como ya estableció nuestro grupo (Porrás et al. 2004). De hecho, Bax juega un importante papel en el proceso de apoptosis inducido por la ausencia de suero.

También es importante destacar la regulación diferencial de BNIP-3 en respuesta al tratamiento con H₂O₂. Así, el aumento en los niveles de BNIP-3 en las células de fenotipo silvestre con silenciamiento de C3G puede ser relevante para explicar su mayor supervivencia en respuesta al estrés oxidativo, lo cual, estaría de acuerdo con algunos datos de la literatura (Zhang et al. 2009; Zhang y Ney 2009; Bellot et al. 2009). Así, aunque clásicamente se ha otorgado a BNIP-3 una función proapoptótica, hoy en día se sabe que puede jugar un papel dual en la regulación de la muerte celular funcionando tanto como inductor de apoptosis o de supervivencia (Zhang y Ney 2009). Existen diferentes situaciones en las que BNIP-3 aumenta y da lugar a supervivencia, como ocurre en la isquemia/reperfusión (Zhang y Ney 2009) o en la respuesta a hipoxia (Zhang y Ney 2009; Bellot et al. 2009).

La función de p38 α en respuesta al estrés oxidativo, parece ser dual. Así, dependiendo del tipo de estímulo, dosis, tipo celular y otros factores parece ejercer funciones opuestas. De hecho, la activación sostenida de p38 α en respuesta a las ROS ha sido implicada en apoptosis (Tobiame et al. 2001), aunque niveles bajos de estrés oxidativo pueden inducir una parada del ciclo celular dependiente de p38 MAPK (Kurata 2000). Además, se ha demostrado recientemente que las ROS generados por oncogenes serían capaces de activar a p38 α e inducir apoptosis, lo cual contribuiría a la inhibición del proceso tumoral en sus etapas iniciales (Dolado et al. 2007). Por el contrario, nosotros mostramos en la presente memoria que la activación de p38 α en MEFs en respuesta al H₂O₂ protege a las células de la muerte celular, por lo que las células deficientes en p38 α no son capaces de sobrevivir. Ya se había asociado la activación de p38 α por H₂O₂ con supervivencia celular a través de diferentes mecanismos, entre los que se incluyen, el incremento en la expresión de algunos enzimas implicadas en la defensa contra el estrés oxidativo como la catalasa (Sen et al. 2005) o hemooxigenasa-1 (Aggeli et al. 2006). Sin embargo, las dosis de H₂O₂ y los tiempos de tratamiento utilizados en estos estudios eran distintos. En cualquier caso, el estrés oxidativo es capaz de activar a p38 α en muchos modelos celulares, y esta activación puede regular de diferente manera algunas funciones celulares, como son el balance supervivencia/apoptosis o la proliferación. De acuerdo con esto, es importante destacar, que las líneas de MEFs utilizadas en este estudio no son tumorales, por lo que pueden responder de una manera distinta a las ROS que los MEFs transformados con Ras.

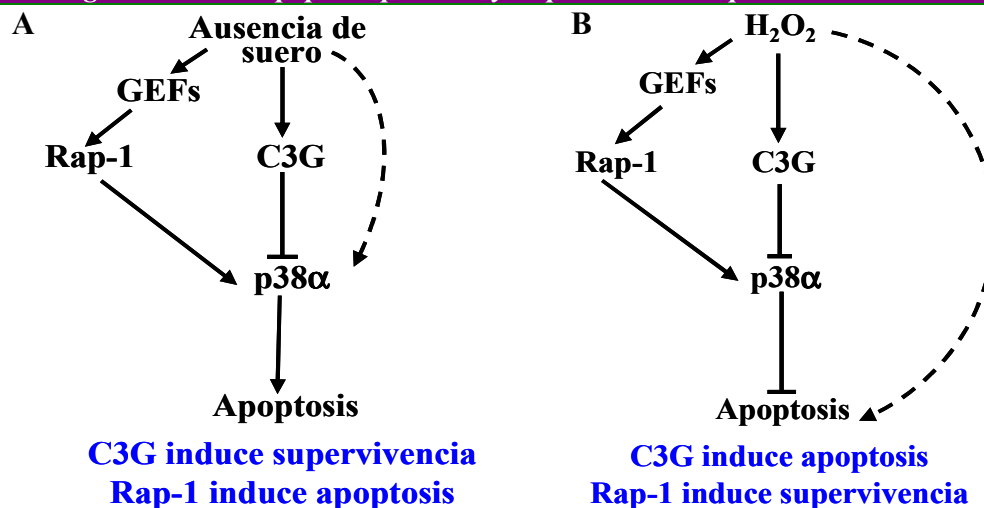
Junto con los datos aquí presentados, también hemos encontrado que el silenciamiento de C3G regula positivamente la actividad de Akt y ERKs en respuesta al estrés oxidativo a través de un mecanismo parcialmente dependiente de p38 α (datos no publicados de nuestro grupo). Por el contrario, Rap-1 es un mediador de la activación de Akt en las células que expresan p38 α . Por tanto, es posible que Akt y/o ERKs puedan también contribuir a la regulación del balance entre supervivencia y apoptosis bajo nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, datos preliminares de nuestro laboratorio indican que p38 α sería más relevante en la mediación de supervivencia.

En conclusión, hemos visto que C3G a través de la regulación negativa de la actividad de p38 α MAPK desempeña un papel dual en la regulación de la muerte celular en MEFs dependiendo del tipo de estímulo. Por un lado, C3G media la muerte celular

en respuesta a estrés oxidativo, mientras que induce supervivencia celular en condiciones de ausencia de suero. Sin embargo, esta función de C3G no está mediada por Rap-1, en contra a lo observado en líneas de Leucemia Mieloide Crónica. Es más, Rap-1 desempeña el papel opuesto en la regulación de la muerte celular, aunque sus efectos también son dependientes de la actividad de p38 α . Por tanto, nuestros datos indican que la p38 α MAPK juega un papel central como mediador de supervivencia celular en un contexto de estrés. En este modelo, C3G y Rap-1 convergerían en p38 α MAPK para regular el balance muerte celular/supervivencia. Sería importante conocer en un futuro si el efecto de Rap-1 sobre p38 α descrito aquí es dependiente del tipo celular, el estímulo o incluso de la capacidad tumoral de las células. Esta última posibilidad podría abrir nuevas perspectivas terapéuticas para el tratamiento del cáncer.

En base a esto, hemos propuesto un modelo que explique las funciones de C3G y Rap-1 en la regulación de p38 α y de la muerte celular en respuesta a estrés (Fig. 58). En condiciones de ausencia de suero, C3G inhibiría la activación de p38 α dando lugar a supervivencia celular. Por el contrario, la activación de Rap-1 por GEFs alternativos (diferentes de C3G) mediaría la estimulación de p38 α , lo que daría lugar a un proceso de apoptosis (Fig. 58A). Sin embargo, en respuesta a estrés oxidativo (H₂O₂), C3G induciría apoptosis a través de la regulación negativa de la actividad de p38 α , mientras que Rap-1, activado por otros GEFs diferentes de C3G, sería un mediador de supervivencia vía p38 α (Fig. 58B).

Figura 58: Regulación de la apoptosis por C3G y Rap-1 a través de p38αMAPK.



Modelo propuesto para la regulación de p38α por C3G y Rap-1 en MEFs y sus efectos sobre el balance supervivencia/apoptosis. A) En respuesta a la ausencia de suero, C3G induce supervivencia a través de la regulación negativa de p38α, mientras que la activación de Rap-1 por otros GEFs, conduce a la activación de p38α induciendo apoptosis. B) En respuesta a estrés oxidativo (H₂O₂), C3G induce apoptosis debido a la inhibición de la actividad de p38α, mientras que Rap-1 (activado por otros GEFs) induce supervivencia celular vía p38α.

3. p38α MAPK DESEMPEÑA UNA FUNCIÓN DUAL EN LA REGULACIÓN DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ESTRÉS OXIDATIVO

Nuestros resultados demuestran que p38α desempeña una función dual en respuesta al estrés oxidativo. Por un lado, tratamientos cortos de H₂O₂, especialmente a dosis bajas, dan lugar a un incremento en la muerte en las células que expresan p38α, mientras que a tiempos largos la activación de p38α en MEFs protege a las células de la muerte celular.

Los datos de la literatura generalmente coinciden en que la respuesta celular a las ROS va a depender, entre otras cosas, de las características del estímulo, tanto de la duración como de la intensidad. Normalmente, se considera que exposiciones largas conducen a la apoptosis, mientras que exposiciones cortas dan lugar a la supervivencia y/o a la diferenciación celular (Matsuzawa y Ichijo 2008).

Es conocido el papel de p38α MAPK como coordinador de la respuesta celular a estímulos de estrés (Rouse et al. 1994; Nebreda y Porras 2000) y su, cada vez más relevante, implicación en la mediación de procesos fisiológicos en respuesta a las ROS. La función de p38α en respuesta al estrés oxidativo depende del estímulo, dosis y tipo

celular, así como de otros factores. Así por ejemplo, p38 α ha sido implicada tanto en la inducción de apoptosis (Tobiume et al. 2001), como en la parada del ciclo celular (Kurata 2000) en respuesta a ROS. También se había asociado la activación de p38 α MAPK por H₂O₂ con supervivencia celular a través de diferentes mecanismos, incluyendo el incremento en la expresión de algunas enzimas antioxidantes como la catalasa (Sen et al. 2005) o hemoxigenasa (Aggeli et al. 2006).

De acuerdo con estos datos, parece que el destino celular vendría determinado por el balance resultante de la activación de diferentes rutas. Actualmente, las ROS han pasado de ser consideradas un subproducto tóxico, a ser consideradas compuestos involucrados en las rutas de transducción de señales como mediadores (Hancock et al. 2001). Por ello, el papel dual de p38 α podría ser el resultado de una activación diferencial de distintas rutas de señalización dependientes de la presencia de p38 α que podría variar dependiendo del tiempo y de la dosis de H₂O₂ empleada. Además, la intensidad y duración de la activación de p38 α podrían jugar un papel importante. Los resultados que hemos obtenido con las células deficientes en p38 α , MKK3 o MKK6 ponen de manifiesto la importancia de la isoforma p38 α en la regulación de la muerte inducida por estrés oxidativo, así como de su nivel de activación. Así, la viabilidad en respuesta al H₂O₂ se mantiene en los MEFs deficientes en MKK6, los cuales tienen una actividad de p38 α relativamente alta. Sin embargo, en las células deficientes en MKK3, que tienen una baja activación de p38 α en respuesta al H₂O₂ (ver figura 49 y 50), la viabilidad es menor y aún menor en los MEFs deficientes en p38 α , en donde no hay activación de esta quinasa. De acuerdo con esto, parece que existe una correlación entre la viabilidad y la actividad de p38 α . Así, aunque en los MEFs deficientes en MKK3 el descenso de viabilidad no sea significativo, se correlaciona con una menor actividad de p38 α y apoya la idea de que el nivel de activación de p38 α es importante para proteger a la célula del estrés oxidativo.

El análisis de las activaciones de diferentes rutas de señalización nos indica que las células responden a la estimulación con H₂O₂ activando varias rutas de transducción de señales, tanto de supervivencia como de muerte. Se activan las rutas de respuesta a estrés, p38 y JNK (dato no mostrado), y paralelamente las rutas de PI3K/Akt y ERKs, clásicamente consideradas de supervivencia, que lo hacen de manera diferencial, según expresen o no p38 α .

Entre las rutas de supervivencia, hemos analizado con más detalle la ruta de mTOR/p70S6K y hemos observado que se produce un desacoplamiento entre la activación de Akt y la de mTOR/p70S6K en respuesta a estrés oxidativo en las células deficientes en p38 α , de manera que las células que expresan p38 α tienen una mayor actividad de mTOR/p70S6K a pesar de la menor activación de Akt. Este desacoplamiento potencialmente podría explicar la mayor sensibilidad de estas células a la muerte por estrés oxidativo, dado que mTOR puede mediar supervivencia a través de diferentes mecanismos que incluyen la regulación de la síntesis de proteínas (Edinger y Thompson 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos al inhibir mTORC1 con rapamicina no confirmaron esta hipótesis, y de hecho, la rapamicina no tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad en respuesta al H₂O₂.

Respecto a la AMPK, un regulador negativo de mTORC1, nuestros resultados parecen indicar que las diferencias en la actividad de la AMPK no serían responsables de la diferente activación de mTOR/p70S6K, y por tanto, de la viabilidad en MEFs con o sin p38 α . De hecho, en las células de fenotipo silvestre, la activación de la AMPK es mayor, y aún así, la ruta mTOR/p70S6K presenta mayor activación.

Existen otras proteínas que se podrían activar por estrés oxidativo y que podrían inhibir la ruta de mTOR en las células p38 α -/- desacoplándola de la activación de Akt como por ejemplo BNIP-3 o REDD-1. Incluso, podrían tener un efecto independiente de la regulación de la ruta de mTOR, como ocurre con BNIP-3. Como hemos comentado anteriormente, BNIP-3 puede jugar un papel dual en la regulación de la muerte celular, funcionando tanto como inductor de apoptosis o como mediador de supervivencia (Zhang y Ney 2009). En nuestro modelo experimental, los niveles de BNIP-3 basales son algo superiores en las células de fenotipo silvestre que en las deficientes en p38 α -/- (ver figura 47) y estos niveles se mantienen a lo largo del tratamiento con H₂O₂. Aunque es posible que BNIP-3 juegue algún papel en la supervivencia, no tenemos suficientes datos que lo demuestren.

Por otro lado, REDD1 es una proteína inducida transcripcionalmente, bajo una amplia variedad de estímulos de estrés como hipoxia, estrés oxidativo, estrés energético o estrés del retículo endoplasmático (Brugarolas et al. 2004; Jin et al. 2007). Es una diana transcripcional de p53 y p63 y está implicada en la regulación de ambas proteínas (Ellisen et al. 2002). También está implicada en la regulación negativa de mTOR/p70S6K, y de hecho, hay datos que indican que la sobreexpresión de REDD1 es

suficiente para inhibir a mTOR (Corradetti et al. 2005). Se ha demostrado que la activación del factor de transcripción ATF4 promueve la regulación negativa de mTOR a través de la inducción de la transcripción de REDD1 en respuesta a estrés oxidativo y estrés del retículo endoplasmático (Jin et al. 2009). Aún no se conoce con exactitud el mecanismo de la inhibición de mTOR por REDD1, aunque parece que actuaría a nivel de los TSCs (Jin et al. 2009). En nuestro caso, no sabemos si REDD1 está implicada.

Otro posible mecanismo que explique la diferente activación de mTOR/p70S6K en presencia o ausencia de p38 α , podría estar basado en una expresión diferencial de Rheb, tal y como ha sido descrito en el laboratorio del Dr. Julio Aguirre (Schewe y Aguirre-Ghiso 2008). En ese caso, se ha demostrado que la baja actividad de p38 MAPK en la línea tumorigénica T-Hep-3 daba lugar a una menor activación de mTOR/p70S6K debido a una menor expresión de Rheb, que es dependiente de la ruta p38/ATF6 (Schewe y Aguirre-Ghiso 2008). Este mecanismo podría estar también operando en los MEFs tratados con H₂O₂. Sin embargo, los análisis de Rheb realizados en colaboración con este grupo parecen indicar que no hay diferencias significativas en los niveles de Rheb en los MEFs con o sin p38 α (datos no mostrados).

Otra cuestión que merece la pena comentar se refiere a la posible implicación de Akt como mediador de la muerte inducida por H₂O₂. Datos recientes indican que la Akt puede sensibilizar a las células al estrés oxidativo induciendo senescencia celular y/o apoptosis (Nogueira et al. 2008). Se ha demostrado que la activación de Akt, puede sensibilizar a las células frente a la apoptosis inducida por el incremento de las ROS, a través del aumento en el consumo de oxígeno y de la inhibición de la expresión de proteínas de protección frente a las ROS, como es la catalasa (Nogueira et al. 2008). De hecho, los MEFs deficientes en Akt son más resistentes a la muerte inducida por estrés oxidativo (Nogueira et al. 2008). De acuerdo con esto, sería posible que Akt estuviera jugando un papel en nuestro sistema celular, dado que la activación de Akt en los MEFs de fenotipo silvestre es menor que en las células deficientes en p38 α , lo cual, podría contribuir a la protección frente a la muerte celular inducida por estrés oxidativo. De hecho, los niveles de SOD y catalasa son inferiores en los MEFs deficientes en p38 α , en dónde la activación de Akt es mucho más elevada. Sin embargo, la inhibición de Akt con el inhibidor, A443654, dio lugar a datos contradictorios, como fue la inducción de una alta fosforilación de Akt, pero nula fosforilación de sus principales efectores (datos no mostrados), así como un efecto dudoso sobre la viabilidad. Está descrito que este

inhibidor produce un incremento en la autofosforilación de Akt en Ser473 como consecuencia de su inhibición, que da lugar a una mayor activación del complejo mTORC2 (Han et al. 2007), pero tampoco sus efectos explicaban la alta sensibilidad de las células deficientes en p38 α a la muerte celular inducida por estrés oxidativo.

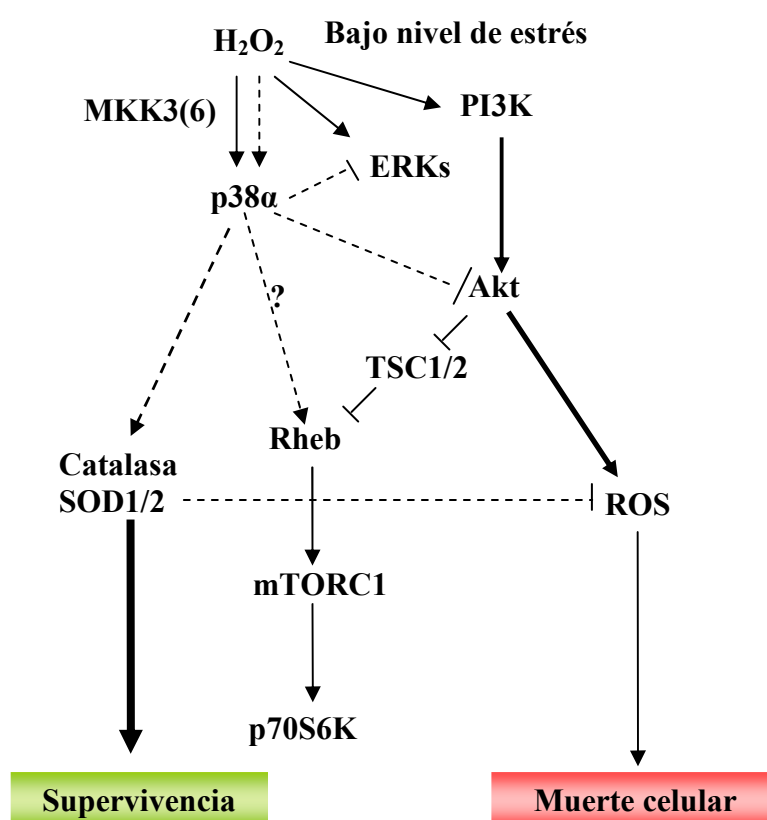
Otra ruta activada por el tratamiento con H₂O₂ es la ruta de las ERKs, cuyo papel en respuesta al estrés oxidativo es controvertido. Clásicamente, se ha asociado la activación de las ERKs con protección frente al estrés oxidativo (Guyton et al. 1996, Wang et al. 1998), aunque también se ha demostrado la implicación de las ERKs en la apoptosis inducida por H₂O₂ en oligodendrocitos (Brand et al. 2001) u osteoblastos (Park et al. 2005). De acuerdo con esto último, sería posible que en las células deficientes en p38 α , en donde la activación de las ERKs es mayor que en los MEFs que expresan p38 α (Porrás et al. 2004), esta ruta pudiera ser un mediador de la muerte inducida por H₂O₂. Sin embargo, datos no publicados de nuestro laboratorio indican que la inhibición de esta ruta con PD98059 no aumenta la viabilidad de las células deficientes en p38 α en respuesta al H₂O₂. Por tanto, pensamos que la mayor activación de ERKs tampoco explicaría la mayor muerte celular presentada por las células deficientes en p38 α en respuesta al estrés oxidativo.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, la hipótesis más plausible para explicar la mayor inducción de muerte en las células p38 α -/- en respuesta al H₂O₂ sería la menor expresión de proteínas anti-oxidantes debido "*per se*" a la ausencia de p38 α . De hecho, las células deficientes en p38 α presentaban mayores niveles ROS que las de fenotipo silvestre tras la estimulación con H₂O₂. Estas ROS se irían acumulando en las células deficientes en p38 α hasta alcanzar altos valores que desencadenarían la muerte celular inducida por estrés oxidativo. En las células de fenotipo silvestre, por el contrario, p38 α sería capaz de mantener un nivel de enzimas anti-oxidantes como SOD o catalasa, capaz de eliminar las ROS, disminuyendo así sus efectos tóxicos. De hecho, el tratamiento con análogos no metabolizables de H₂O₂ como el tertbutilo-hidroperóxido, reduce drásticamente la viabilidad en ambas líneas celulares, aunque también en estos tratamientos, se puede apreciar la protección frente a la muerte inducida por estrés oxidativo ejercida por p38 α (datos no mostrados).

En conclusión, estos resultados asignan un nuevo papel a p38 α como protector del estrés oxidativo. De acuerdo con esta función, p38 α estaría protegiendo frente a un exceso de niveles de ROS disminuyendo su acumulación en las células expuestas a

estrés oxidativo. En relación con esto, la p38 α evitaría el colapso celular en células con una alta tasa metabólica o de proliferación, como la que se da en las células tumorales. Por otro lado, la p38 α activaría la apoptosis en respuesta a altos niveles de estrés oxidativo o a la producción de ROS inducida por oncogenes en células, inhibiendo así las fases iniciales de la transformación tumoral (Dolado et al. 2007). Este papel dual de p38 α como regulador de la supervivencia y muerte celular está de acuerdo con muchas evidencias que indican que p38 α contribuye a la progresión tumoral, mientras que en las fases iniciales juega un papel opuesto.

Figura 59: Regulación por p38 α de la muerte celular inducida por estrés oxidativo



Modelo que muestra el papel de p38 α en la regulación de la muerte celular inducida por estrés oxidativo en MEFs. La presencia de H₂O₂ a bajos niveles activa la ruta MKK3(6)/p38 α y PI3K/Akt. p38 α regula negativamente a Akt y mantiene activa la ruta mTORC1/p70S6K. La activación de p38 α regularía la expresión de enzimas antioxidantes como SOD y catalasa. La ausencia de p38 α conduce a una hiperactivación de Akt y a una deficiencia de enzimas antioxidantes, que da lugar a un aumento en los niveles de ROS que conducirían a la muerte de esas células.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. En ausencia de suero, la p38 α MAPK regula positivamente la activación de Rac-1 y la formación de complejos Rac-1-caveolina-1 en líneas derivadas de cardiomiocitos embrionarios de ratón a través de un mecanismo dependiente de adhesión. Esto permite la localización de una fracción importante de la proteína Rac-1 activa en las caveolas.
2. La organización del citoesqueleto de actina en forma de fibras de estrés mediada por p38 α promueve la interacción entre caveolina-1 y Rac-1, así como la activación de Rac-1 en líneas derivadas de cardiomiocitos embrionarios de ratón mantenidos en ausencia de suero. Por ello, la ausencia de p38 α o la desorganización del citoesqueleto de actina con citocalasina impiden dicha interacción, así como la activación de Rac-1.
3. Por el contrario, p38 α regula negativamente la actividad de Rac-1 en líneas derivadas de cardiomiocitos embrionarios de ratón cuando el suero está presente. Además, en estas condiciones, Rac-1 apenas interacciona con caveolina-1, la cual, se encuentra internalizada, independientemente de la presencia de p38 α .
4. La inhibición de Rac-1 por p38 α en líneas derivadas de cardiomiocitos embrionarios de ratón mantenidas en presencia de factores de crecimiento (es decir, con suero) es responsable de la regulación negativa de la adhesión ejercida por p38 α .
5. C3G regula negativamente la activación de la p38 α MAPK en respuesta a diferentes tipos de estrés en líneas celulares derivadas de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) a través de un mecanismo independiente de Rap-1.
6. Por el contrario, el efector más importante de C3G, Rap-1, media la activación de p38 α MAPK en respuesta a estrés en MEFs.
7. Dependiendo del estímulo pro-apoptótico, C3G, a través de la regulación negativa de la actividad de p38 α , induce supervivencia o apoptosis en MEFs. Así, en respuesta a la ausencia de suero, C3G favorece la supervivencia celular, mientras que en respuesta al H₂O₂ induce apoptosis.
8. Sin embargo, Rap-1 ejerce el efecto contrario a C3G sobre la muerte también a través de la regulación de p38 α . Así, Rap-1, a través de la activación de p38 α , media apoptosis en respuesta a la ausencia de suero, mientras que en respuesta al H₂O₂ favorece la supervivencia celular.

9. C3G y Rap-1, a través de p38 α , regulan los niveles de Bim, Bcl-x_L y BNIP-3, habiendo una correlación entre los niveles de Bim y Bcl-x_L (Bim/Bcl-x_L) y los niveles de apoptosis en respuesta a la ausencia de suero o al estrés oxidativo en MEFs. Además, en respuesta al H₂O₂, BNIP-3 se induce al hiperactivarse p38 α mediante el silenciamiento de C3G.
10. p38 α MAPK protege de la muerte celular inducida por estrés oxidativo mediante tratamiento con H₂O₂ a tiempos largos y dosis moderadas en MEFs. Esto implica una función dual de p38 α en la regulación de la muerte celular dependiendo del tipo de estímulo.
11. p38 α MAPK regula positivamente la activación de la ruta de supervivencia mTOR/p70S6K en respuesta al estrés oxidativo en MEFs. Dicha activación no se correlaciona con la actividad de su regulador positivo, Akt, o de su regulador negativo, AMPK.
12. La inhibición de mTORC1 con rapamicina no sensibiliza a las células que expresan p38 α a la muerte celular en respuesta al estrés oxidativo en MEFs, lo que indica que la supervivencia mediada por p38 α en estas condiciones no está mediada por mTOR/p70S6K.
13. p38 α MAPK previene de la acumulación de especies reactivas de oxígeno, lo cual se correlaciona con un mayor nivel de expresión de las enzimas antioxidantes, SOD y catalasa, cuando p38 α está presente en los MEFs. La presencia de estas proteínas protectoras frente al estrés oxidativo se correlaciona con un menor nivel de muerte.

Bibliografia

- Adams, R. H., A. Porras, et al. (2000). "Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development." *Mol Cell* 6(1): 109-16.
- Aggeli, I. K., C. Gaitanaki, et al. (2006). "Involvement of JNKs and p38-MAPK/MSK1 pathways in H₂O₂-induced upregulation of heme oxygenase-1 mRNA in H9c2 cells." *Cell Signal* 18(10): 1801-12.
- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, et al. (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." *EMBO J* 15(23): 6541-51.
- Alsayed, Y., S. Modi, et al. (2000). "All-trans-retinoic acid induces tyrosine phosphorylation of the CrkL adaptor in acute promyelocytic leukemia cells." *Exp Hematol* 28(7): 826-32.
- Anderson, R. G. (1993). "Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 10909-13.
- Aouadi, M., B. Binetruy, et al. (2006). "Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice." *Biochimie* 88(9): 1091-8.
- Aravamudan, B., D. Volonte, et al. (2003). "Transgenic overexpression of caveolin-3 in the heart induces a cardiomyopathic phenotype." *Hum Mol Genet* 12(21): 2777-88.
- Badger, A. M., M. N. Cook, et al. (1998). "SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes." *J Immunol* 161(1): 467-73.
- Balzac, F., M. Avolio, et al. (2005). "E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function." *J Cell Sci* 118(Pt 20): 4765-83.
- Beardmore, V. A., H. J. Hinton, et al. (2005). "Generation and characterization of p38beta (MAPK11) gene-targeted mice." *Mol Cell Biol* 25(23): 10454-64.
- Bellot, G., R. Garcia-Medina, et al. (2009). "Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains." *Mol Cell Biol* 29(10): 2570-81.
- Beyaert, R., A. Cuenda, et al. (1996). "The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor." *Embo J* 15(8): 1914-23.
- Bhaskar, P. T. and N. Hay (2007). "The two TORCs and Akt." *Dev Cell* 12(4): 487-502.
- Bihani, T., D. X. Mason, et al. (2004). "Differential oncogenic Ras signaling and senescence in tumor cells." *Cell Cycle* 3(9): 1201-7.
- Birge, R. B., C. Kalodimos, et al. (2009). "Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling." *Cell Commun Signal* 7: 13.
- Bogoyevitch, M. A. and N. W. Court (2004). "Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8." *Cell Signal* 16(12): 1345-54.
- Bokoch, G. M. (2003). "Biology of the p21-activated kinases." *Annu Rev Biochem* 72: 743-81.
- Bokoch, G. M. and C. J. Der (1993). "Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins." *FASEB J* 7(9): 750-9.
- Boriack-Sjodin, P. A., S. M. Margarit, et al. (1998). "The structural basis of the activation of Ras by Sos." *Nature* 394(6691): 337-43.
- Bos, J. L., J. de Rooij, et al. (2001). "Rap1 signalling: adhering to new models." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(5): 369-77.

- Boulton, A. J. and R. Gokal (1990). "Diabetes and ACE inhibitors." *J Hum Hypertens* 4 Suppl 4: 63-6; discussion 66-7.
- Boya, P., M. A. Mellen, et al. (2008). "How autophagy is related to programmed cell death during the development of the nervous system." *Biochem Soc Trans* 36(Pt 5): 813-7.
- Braga, V. M. (2002). "Cell-cell adhesion and signalling." *Curr Opin Cell Biol* 14(5): 546-56.
- Bragado, P., A. Armesilla, et al. (2007). "Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation." *Apoptosis* 12(9): 1733-42.
- Brand, A., S. Gil, et al. (2001). "Lipid constituents in oligodendroglial cells alter susceptibility to H2O2-induced apoptotic cell death via ERK activation." *J Neurochem* 76(3): 910-8.
- Brewster, J. L., T. de Valoir, et al. (1993). "An osmosensing signal transduction pathway in yeast." *Science* 259(5102): 1760-3.
- Brugarolas, J., K. Lei, et al. (2004). "Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex." *Genes Dev* 18(23): 2893-904.
- Buchsbaum, R. J., B. A. Connolly, et al. (2002). "Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade." *Mol Cell Biol* 22(12): 4073-85.
- Buensuceso, C. S. and T. E. O'Toole (2000). "The association of CRKII with C3G can be regulated by integrins and defines a novel means to regulate the mitogen-activated protein kinases." *J Biol Chem* 275(17): 13118-25.
- Bulavin, D. V. and A. J. Fornace, Jr. (2004). "p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor." *Adv Cancer Res* 92: 95-118.
- Bustelo, X. R. (2002). "Knocked out by Rho/Rac T-cell biology." *Histol Histopathol* 17(3): 871-5.
- Bustelo, X. R. (2002). "Understanding Rho/Rac biology in T-cells using animal models." *Bioessays* 24(7): 602-12.
- Bustelo, X. R., V. Sauzeau, et al. (2007). "GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo." *Bioessays* 29(4): 356-70.
- Cai, B. and Z. Xia (2008). "p38 MAP kinase mediates arsenite-induced apoptosis through FOXO3a activation and induction of Bim transcription." *Apoptosis* 13(6): 803-10.
- Cai, J., J. Yang, et al. (1998). "Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c." *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2): 139-49.
- Caloca, M. J., H. Wang, et al. (2003). "Characterization of the Rac-GAP (Rac-GTPase-activating protein) activity of beta2-chimaerin, a 'non-protein kinase C' phorbol ester receptor." *Biochem J* 375(Pt 2): 313-21.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." *Science* 296(5573): 1655-7.
- Caron, E. (2003). "Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges." *J Cell Sci* 116(Pt 3): 435-40.
- Cho, K. A., S. J. Ryu, et al. (2004). "Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status." *J Biol Chem* 279(40): 42270-8.
- Choi, J. A., M. T. Park, et al. (2004). "Opposite effects of Ha-Ras and Ki-Ras on radiation-induced apoptosis via differential activation of PI3K/Akt and Rac/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways." *Oncogene* 23(1): 9-20.

- Cohen, A. W., B. Razani, et al. (2004). "Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation." *Diabetes* 53(5): 1261-70.
- Cohen, A. W., D. S. Park, et al. (2003). "Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts." *Am J Physiol Cell Physiol* 284(2): C457-74.
- Cohen, A. W., R. Hnasko, et al. (2004). "Role of caveolae and caveolins in health and disease." *Physiol Rev* 84(4): 1341-79.
- Cohen, P. S., H. Schmidtayerova, et al. (1997). "The critical role of p38 MAP kinase in T cell HIV-1 replication." *Mol Med* 3(5): 339-46.
- Coleman, M. L., C. J. Marshall, et al. (2004). "RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(5): 355-66.
- Corradetti, M. N., K. Inoki, et al. (2005). "The stress-induced proteins RTP801 and RTP801L are negative regulators of the mammalian target of rapamycin pathway." *J Biol Chem* 280(11): 9769-72.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* 2(9): 647-56.
- Coso, O. A., M. Chiariello, et al. (1995). "The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway." *Cell* 81(7): 1137-46.
- Coulombe, P. and S. Meloche (2007). "Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions." *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1376-87.
- Cuenda, A. and P. Cohen (1999). "Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis." *J Biol Chem* 274(7): 4341-6.
- Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1358-75.
- Dann, S. G., A. Selvaraj, et al. (2007). "mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer." *Trends Mol Med* 13(6): 252-9.
- Del Pozo, M. A. (2004). "Integrin signaling and lipid rafts." *Cell Cycle* 3(6): 725-8.
- del Pozo, M. A., L. S. Price, et al. (2000). "Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK." *EMBO J* 19(9): 2008-14.
- del Pozo, M. A., N. B. Alderson, et al. (2004). "Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains." *Science* 303(5659): 839-42.
- del Pozo, M. A., N. Balasubramanian, et al. (2005). "Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization." *Nat Cell Biol* 7(9): 901-8.
- DeMali, K. A., K. Wennerberg, et al. (2003). "Integrin signaling to the actin cytoskeleton." *Curr Opin Cell Biol* 15(5): 572-82.
- Deschesnes, R. G., J. Huot, et al. (2001). "Involvement of p38 in apoptosis-associated membrane blebbing and nuclear condensation." *Mol Biol Cell* 12(6): 1569-82.
- Dillon, T. J., K. D. Carey, et al. (2005). "Regulation of the small GTPase Rap1 and extracellular signal-regulated kinases by the costimulatory molecule CTLA-4." *Mol Cell Biol* 25(10): 4117-28.
- Dolado, I., A. Swat, et al. (2007). "p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis." *Cancer Cell* 11(2): 191-205.

- Dong, C., R. J. Davis, et al. (2002). "MAP kinases in the immune response." *Annu Rev Immunol* 20: 55-72.
- Eden, S., R. Rohatgi, et al. (2002). "Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck." *Nature* 418(6899): 790-3.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2002). "Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake." *Mol Biol Cell* 13(7): 2276-88.
- Ehrhardt, A., G. R. Ehrhardt, et al. (2002). "Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together." *Exp Hematol* 30(10): 1089-106.
- Ellisen, L. W., K. D. Ramsayer, et al. (2002). "REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species." *Mol Cell* 10(5): 995-1005.
- Engelman, J. A., X. L. Zhang, et al. (1999). "p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. Activation of Ras-MAP kinase and protein kinase a signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity." *J Biol Chem* 274(45): 32333-41.
- English, J. M. and M. H. Cobb (2002). "Pharmacological inhibitors of MAPK pathways." *Trends Pharmacol Sci* 23(1): 40-5.
- English, J., G. Pearson, et al. (1999). "New insights into the control of MAP kinase pathways." *Exp Cell Res* 253(1): 255-70.
- Eom, Y. W., M. H. Yoo, et al. (2001). "Implication of the small GTPase Rac1 in the apoptosis induced by UV in Rat-2 fibroblasts." *Biochem Biophys Res Commun* 285(3): 825-9.
- Eom, Y. W., S. H. Cho, et al. (2001). "Rac and p38 kinase mediate 5-lipoxygenase translocation and cell death." *Biochem Biophys Res Commun* 284(1): 126-32.
- Fan, J. Y., J. L. Carpentier, et al. (1983). "The interaction of 125I-insulin with cultured 3T3-L1 adipocytes: quantitative analysis by the hypothetical grain method." *J Histochem Cytochem* 31(7): 859-70.
- Faust, D., I. Dolado, et al. (2005). "p38alpha MAPK is required for contact inhibition." *Oncogene* 24(53): 7941-5.
- Feller, S. M. (2001). "Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles." *Oncogene* 20(44): 6348-71.
- Feller, S. M., R. Ren, et al. (1994). "SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl." *Trends Biochem Sci* 19(11): 453-8.
- Fiorentini, C., L. Falzano, et al. (2003). "Hijacking Rho GTPases by protein toxins and apoptosis: molecular strategies of pathogenic bacteria." *Cell Death Differ* 10(2): 147-52.
- Frank, P. G., Y. L. Marcel, et al. (2002). "Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I." *Biochemistry* 41(39): 11931-40.
- Freshney, N. W., L. Rawlinson, et al. (1994). "Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27." *Cell* 78(6): 1039-49.
- Fresno Vara, J. A., E. Casado, et al. (2004). "PI3K/Akt signalling pathway and cancer." *Cancer Treat Rev* 30(2): 193-204.
- Fruehauf, J. P. and F. L. Meyskens, Jr. (2007). "Reactive oxygen species: a breath of life or death?" *Clin Cancer Res* 13(3): 789-94.

- Fukuyama, T., H. Ogita, et al. (2005). "Involvement of the c-Src-Crk-C3G-Rap1 signaling in the nectin-induced activation of Cdc42 and formation of adherens junctions." *J Biol Chem* 280(1): 815-25.
- Garrido, C., L. Galluzzi, et al. (2006). "Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria." *Cell Death Differ* 13(9): 1423-33.
- Ge, B., H. Gram, et al. (2002). "MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha." *Science* 295(5558): 1291-4.
- Ghatan, S., S. Larner, et al. (2000). "p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons." *J Cell Biol* 150(2): 335-47.
- Godl, K., J. Wissing, et al. (2003). "An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26): 15434-9.
- Goedert, M., A. Cuenda, et al. (1997). "Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases." *Embo J* 16(12): 3563-71.
- Gotoh, T., S. Hattori, et al. (1995). "Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G." *Mol Cell Biol* 15(12): 6746-53.
- Gotoh, T., Y. Niino, et al. (1997). "Activation of R-Ras by Ras-guanine nucleotide-releasing factor." *J Biol Chem* 272(30): 18602-7.
- Graf, G. A., P. M. Connell, et al. (1999). "The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters into caveolae." *J Biol Chem* 274(17): 12043-8.
- Grande-Garcia, A. and M. A. del Pozo (2008). "Caveolin-1 in cell polarization and directional migration." *Eur J Cell Biol* 87(8-9): 641-7.
- Gregg, D., F. M. Rauscher, et al. (2003). "Rac regulates cardiovascular superoxide through diverse molecular interactions: more than a binary GTP switch." *Am J Physiol Cell Physiol* 285(4): C723-34.
- Guan, Z., S. Y. Buckman, et al. (1998). "Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway." *J Biol Chem* 273(21): 12901-8.
- Guerrero, C., A. Fernandez-Medarde, et al. (1998). "Transformation suppressor activity of C3G is independent of its CDC25-homology domain." *Oncogene* 16(5): 613-24.
- Guerrero, C., S. Martin-Encabo, et al. (2004). "C3G-mediated suppression of oncogene-induced focus formation in fibroblasts involves inhibition of ERK activation, cyclin A expression and alterations of anchorage-independent growth." *Oncogene* 23(28): 4885-93.
- Gulbins, E., S. Dreschers, et al. (2003). "Role of mitochondria in apoptosis." *Exp Physiol* 88(1): 85-90.
- Guo, F., M. Debidia, et al. (2006). "Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly." *J Biol Chem* 281(27): 18652-9.
- Guo, Y. L. and B. Yang (2006). "Altered cell adhesion and cell viability in a p38alpha mitogen-activated protein kinase-deficient mouse embryonic stem cell line." *Stem Cells Dev* 15(5): 655-64.

- Gutierrez-Berzal, J., E. Castellano, et al. (2006). "Characterization of p87C3G, a novel, truncated C3G isoform that is overexpressed in chronic myeloid leukemia and interacts with Bcr-Abl." *Exp Cell Res* 312(6): 938-48.
- Guyton, K. Z., Y. Liu, et al. (1996). "Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury." *J Biol Chem* 271(8): 4138-42.
- Han, E. K., J. D. Levenson, et al. (2007). "Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition." *Oncogene* 26(38): 5655-61.
- Han, J., J. D. Lee, et al. (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." *Science* 265(5173): 808-11.
- Han, J., K. Luby-Phelps, et al. (1998). "Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav." *Science* 279(5350): 558-60.
- Hancock, J. T., R. Desikan, et al. (2001). "Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways." *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2): 345-50.
- Haq, R., J. D. Brenton, et al. (2002). "Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence." *Cancer Res* 62(17): 5076-82.
- Harder, T. and K. Simons (1999). "Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation." *Eur J Immunol* 29(2): 556-62.
- Hattori, M. and N. Minato (2003). "Rap1 GTPase: functions, regulation, and malignancy." *J Biochem* 134(4): 479-84.
- Hattori, S. and M. Matsuda (1997). "[Activation of Rap1, antagonist to ras, by Crk-C3G]." *Gan To Kagaku Ryoho* 24(11): 1414-21.
- Head, B. P., H. H. Patel, et al. (2006). "Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components." *J Biol Chem* 281(36): 26391-9.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* 407(6805): 770-6.
- Hnasko, R. and M. P. Lisanti (2003). "The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease." *Mol Interv* 3(8): 445-64.
- Ho, C. C., P. H. Huang, et al. (2002). "Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation." *Am J Pathol* 161(5): 1647-56.
- Hogan, C., N. Serpente, et al. (2004). "Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts." *Mol Cell Biol* 24(15): 6690-700.
- Hsu, S. C., M. A. Gavrilin, et al. (1999). "p38 mitogen-activated protein kinase is involved in Fas ligand expression." *J Biol Chem* 274(36): 25769-76.
- Hubner, A., T. Barrett, et al. (2008). "Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity." *Mol Cell* 30(4): 415-25.
- Ichiba, T., Y. Hashimoto, et al. (1999). "Activation of C3G guanine nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine 504." *J Biol Chem* 274(20): 14376-81.
- Innocenti, M., E. Frittoli, et al. (2003). "Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1." *J Cell Biol* 160(1): 17-23.

- Innocenti, M., P. Tenca, et al. (2002). "Mechanisms through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac." *J Cell Biol* 156(1): 125-36.
- Ito, K., A. Hirao, et al. (2006). "Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells." *Nat Med* 12(4): 446-51.
- Jacobson, K., O. G. Mouritsen, et al. (2007). "Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics." *Nat Cell Biol* 9(1): 7-14.
- Jiang, Y., C. Chen, et al. (1996). "Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)." *J Biol Chem* 271(30): 17920-6.
- Jiang, Y., H. Gram, et al. (1997). "Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta." *J Biol Chem* 272(48): 30122-8.
- Jin, H. O., S. An, et al. (2007). "Hypoxic condition- and high cell density-induced expression of Redd1 is regulated by activation of hypoxia-inducible factor-1alpha and Sp1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway." *Cell Signal* 19(7): 1393-403.
- Jin, H. O., S. K. Seo, et al. (2009). "SP600125 negatively regulates the mammalian target of rapamycin via ATF4-induced Redd1 expression." *FEBS Lett* 583(1): 123-7.
- Jin, S., R. S. DiPaola, et al. (2007). "Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death." *J Cell Sci* 120(Pt 3): 379-83.
- Johnson, M. S., N. Lu, et al. (2009). "Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms." *Biochim Biophys Acta* 1788(4): 779-89.
- Jordan, P., R. Brazao, et al. (1999). "Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors." *Oncogene* 18(48): 6835-9.
- Kamata, H. and H. Hirata (1999). "Redox regulation of cellular signalling." *Cell Signal* 11(1): 1-14.
- Kao, S., R. K. Jaiswal, et al. (2001). "Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells." *J Biol Chem* 276(21): 18169-77.
- Kato, K., Y. Hida, et al. (2002). "Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage." *Cancer* 94(4): 929-33.
- Kiosses, W. B., S. J. Shattil, et al. (2001). "Rac recruits high-affinity integrin alphavbeta3 to lamellipodia in endothelial cell migration." *Nat Cell Biol* 3(3): 316-20.
- Kirsch, K. H., M. M. Georgescu, et al. (1998). "Direct binding of p130(Cas) to the guanine nucleotide exchange factor C3G." *J Biol Chem* 273(40): 25673-9.
- Knudsen, B. S., S. M. Feller, et al. (1994). "Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk." *J Biol Chem* 269(52): 32781-7.
- Kraemer, A., H. R. Rehmann, et al. (2001). "Dynamic interaction of cAMP with the Rap guanine-nucleotide exchange factor Epac1." *J Mol Biol* 306(5): 1167-77.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." *Nature* 407(6805): 789-95.
- Kroemer, G., W. S. El-Deiry, et al. (2005). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1463-7.

- Kummer, J. L., P. K. Rao, et al. (1997). "Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* 272(33): 20490-4.
- Kurata, S. (2000). "Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress." *J Biol Chem* 275(31): 23413-6.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev* 81(2): 807-69.
- Laferriere, J., F. Houle, et al. (2002). "Regulation of the metastatic process by E-selectin and stress-activated protein kinase-2/p38." *Ann N Y Acad Sci* 973: 562-72.
- Lajoie, P., J. G. Goetz, et al. (2009). "Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane." *J Cell Biol* 185(3): 381-5.
- Lambert, J. M., Q. T. Lambert, et al. (2002). "Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism." *Nat Cell Biol* 4(8): 621-5.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, et al. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." *Nature* 372(6508): 739-46.
- Li, J., E. J. Miller, et al. (2005). "AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart." *Circ Res* 97(9): 872-9.
- Li, L., G. Yang, et al. (2001). "Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells." *Cancer Res* 61(11): 4386-92.
- Li, Z., Y. Jiang, et al. (1996). "The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases." *Biochem Biophys Res Commun* 228(2): 334-40.
- Lin, E. Y., M. Piepkorn, et al. (1999). "Angiogenesis and vascular growth factor receptor expression in malignant melanoma." *Plast Reconstr Surg* 104(6): 1666-74.
- Liu, G. Y., K. J. Chen, et al. (1999). "Peroxyacetyl nitrate-induced apoptosis through generation of reactive oxygen species in HL-60 cells." *Mol Carcinog* 25(3): 196-206.
- Los, M., S. Maddika, et al. (2009). "Switching Akt: from survival signaling to deadly response." *Bioessays* 31(5): 492-5.
- Machesky, L. M. and R. H. Insall (1998). "Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex." *Curr Biol* 8(25): 1347-56.
- Mackay, K. and D. Mochly-Rosen (1999). "An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia." *J Biol Chem* 274(10): 6272-9.
- Maia, V., M. Sanz, et al. (2009). "C3G silencing enhances STI-571-induced apoptosis in CML cells through p38 MAPK activation, but it antagonizes STI-571 inhibitory effect on survival." *Cell Signal* 21(7): 1229-35.
- Manning, B. D. (2004). "Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis." *J Cell Biol* 167(3): 399-403.
- Manser, E. (2002). "Small GTPases take the stage." *Dev Cell* 3(3): 323-8.
- Manser, E., H. Y. Huang, et al. (1997). "Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes." *Mol Cell Biol* 17(3): 1129-43.

- Martin-Encabo, S., E. Santos, et al. (2007). "C3G mediated suppression of malignant transformation involves activation of PP2A phosphatases at the subcortical actin cytoskeleton." *Exp Cell Res* 313(18): 3881-91.
- Mates, J. M. and F. Sanchez-Jimenez (1999). "Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes." *Front Biosci* 4: D339-45.
- Mates, J. M., C. Perez-Gomez, et al. (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." *Clin Biochem* 32(8): 595-603.
- Matsuzawa, A. and H. Ichijo (2008). "Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling." *Biochim Biophys Acta* 1780(11): 1325-36.
- Matsuzawa, A., H. Nishitoh, et al. (2002). "Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice." *Antioxid Redox Signal* 4(3): 415-25.
- McDermott, E. P. and L. A. O'Neill (2002). "Ras participates in the activation of p38 MAPK by interleukin-1 by associating with IRAK, IRAK2, TRAF6, and TAK-1." *J Biol Chem* 277(10): 7808-15.
- McMullen, M. E., P. W. Bryant, et al. (2005). "Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells." *J Biol Chem* 280(22): 20995-1003.
- Mearow, K. M., M. E. Dodge, et al. (2002). "Stress-mediated signaling in PC12 cells - the role of the small heat shock protein, Hsp27, and Akt in protecting cells from heat stress and nerve growth factor withdrawal." *J Neurochem* 83(2): 452-62.
- Mertens, A. E., R. C. Roovers, et al. (2003). "Regulation of Tiam1-Rac signalling." *FEBS Lett* 546(1): 11-6.
- Miki, H., S. Suetsugu, et al. (1998). "WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac." *EMBO J* 17(23): 6932-41.
- Modur, V., G. A. Zimmerman, et al. (1996). "Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor alpha. Ceramide-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase cascades." *J Biol Chem* 271(22): 13094-102.
- Morishima, N., K. Nakanishi, et al. (2004). "Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis." *J Biol Chem* 279(48): 50375-81.
- Mudgett, J. S., J. Ding, et al. (2000). "Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19): 10454-9.
- Nakagawa, T. and J. Yuan (2000). "Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis." *J Cell Biol* 150(4): 887-94.
- Nakagawa, T., H. Zhu, et al. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." *Nature* 403(6765): 98-103.
- Nebreda, A. R. and A. Porras (2000). "p38 MAP kinases: beyond the stress response." *Trends Biochem Sci* 25(6): 257-60.
- Nguyen, T. T., J. C. Scimeca, et al. (1993). "Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. Distinct effects of the neurotrophic factor,

- nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor." *J Biol Chem* **268**(13): 9803-10.
- Nishida, M., S. Tanabe, et al. (2005). "G alpha 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes." *J Biol Chem* **280**(18): 18434-41.
 - Nogueira, V., Y. Park, et al. (2008). "Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis." *Cancer Cell* **14**(6): 458-70.
 - Ohba, Y., K. Ikuta, et al. (2001). "Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis." *EMBO J* **20**(13): 3333-41.
 - Okada, S. and J. E. Pessin (1997). "Insulin and epidermal growth factor stimulate a conformational change in Rap1 and dissociation of the CrkII-C3G complex." *J Biol Chem* **272**(45): 28179-82.
 - Okada, S., M. Matsuda, et al. (1998). "Insulin regulates the dynamic balance between Ras and Rap1 signaling by coordinating the assembly states of the Grb2-SOS and CrkII-C3G complexes." *EMBO J* **17**(9): 2554-65.
 - Okamoto, T., A. Schlegel, et al. (1998). "Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane." *J Biol Chem* **273**(10): 5419-22.
 - Ono, K. and J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." *Cell Signal* **12**(1): 1-13.
 - Otsu, K., N. Yamashita, et al. (2003). "Disruption of a single copy of the p38alpha MAP kinase gene leads to cardioprotection against ischemia-reperfusion." *Biochem Biophys Res Commun* **302**(1): 56-60.
 - Palade, G. E. (1953). "An electron microscope study of the mitochondrial structure." *J Histochem Cytochem* **1**(4): 188-211.
 - Palsson, E. M., M. Popoff, et al. (2000). "Divergent roles for Ras and Rap in the activation of p38 mitogen-activated protein kinase by interleukin-1." *J Biol Chem* **275**(11): 7818-25.
 - Pani, G., R. Colavitti, et al. (2000). "A redox signaling mechanism for density-dependent inhibition of cell growth." *J Biol Chem* **275**(49): 38891-9.
 - Parat, M. O. (2009). "The biology of caveolae: achievements and perspectives." *Int Rev Cell Mol Biol* **273**: 117-62.
 - Park, B. G., C. I. Yoo, et al. (2005). "Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells." *Toxicology* **215**(1-2): 115-25.
 - Park, D. S., S. E. Woodman, et al. (2002). "Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype." *Am J Pathol* **160**(6): 2207-17.
 - Park, J. M., F. R. Greten, et al. (2002). "Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition." *Science* **297**(5589): 2048-51.
 - Parone, P. A., D. James, et al. (2002). "Mitochondria: regulating the inevitable." *Biochimie* **84**(2-3): 105-11.
 - Patel, V., H. M. Rosenfeldt, et al. (2007). "Persistent activation of Rac1 in squamous carcinomas of the head and neck: evidence for an EGFR/Vav2 signaling axis involved in cell invasion." *Carcinogenesis* **28**(6): 1145-52.
 - Pelicano, H., D. Carney, et al. (2004). "ROS stress in cancer cells and therapeutic implications." *Drug Resist Updat* **7**(2): 97-110.

- Porras, A., S. Zuluaga, et al. (2004). "P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli." *Mol Biol Cell* 15(2): 922-33.
- Proud, C. (2007). "The use of oral transmucosal fentanyl citrate during high-dose-rate gynecologic brachytherapy." *Clin J Oncol Nurs* 11(4): 561-7.
- Radha, V., A. Rajanna, et al. (2004). "Phosphorylated guanine nucleotide exchange factor C3G, induced by pervanadate and Src family kinases localizes to the Golgi and subcortical actin cytoskeleton." *BMC Cell Biol* 5: 31.
- Radha, V., A. Rajanna, et al. (2008). "The guanine nucleotide exchange factor, C3G regulates differentiation and survival of human neuroblastoma cells." *J Neurochem* 107(5): 1424-35.
- Raha, S. and B. H. Robinson (2001). "Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis." *Am J Med Genet* 106(1): 62-70.
- Raman, M., W. Chen, et al. (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." *Oncogene* 26(22): 3100-12.
- Ramsauer, K., I. Sadzak, et al. (2002). "p38 MAPK enhances STAT1-dependent transcription independently of Ser-727 phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20): 12859-64.
- Razani, B. and M. P. Lisanti (2001). "Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships." *Exp Cell Res* 271(1): 36-44.
- Razani, B., S. E. Woodman, et al. (2002). "Caveolae: from cell biology to animal physiology." *Pharmacol Rev* 54(3): 431-67.
- Ridley, A. J. (2001). "Cyclin' round the cell with Rac." *Dev Cell* 1(2): 160-1.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, et al. (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." *Cell* 70(3): 401-10.
- Rincon, M. (2001). "MAP-kinase signaling pathways in T cells." *Curr Opin Immunol* 13(3): 339-45.
- Rouse, J., P. Cohen, et al. (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." *Cell* 78(6): 1027-37.
- Rousseau, S., I. Dolado, et al. (2006). "CXCL12 and C5a trigger cell migration via a PAK1/2-p38alpha MAPK-MAPKAP-K2-HSP27 pathway." *Cell Signal* 18(11): 1897-905.
- Sabio, G., J. S. Arthur, et al. (2005). "p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP." *EMBO J* 24(6): 1134-45.
- Sakoda, T., K. Kaibuchi, et al. (1992). "smg/rap1/Krev-1 p21s inhibit the signal pathway to the c-fos promoter/enhancer from c-Ki-ras p21 but not from c-raf-1 kinase in NIH3T3 cells." *Oncogene* 7(9): 1705-11.
- Salanueva, I. J., A. Cerezo, et al. (2007). "Integrin regulation of caveolin function." *J Cell Mol Med* 11(5): 969-80.
- Saltiel, A. R. and J. E. Pessin (2003). "Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane." *Traffic* 4(11): 711-6.
- Salvador, J. M., P. R. Mittelstadt, et al. (2005). "Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases." *Nat Immunol* 6(4): 390-5.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, et al. (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science* 307(5712): 1098-101.

- Sawada, Y., K. Nakamura, et al. (2001). "Rap1 is involved in cell stretching modulation of p38 but not ERK or JNK MAP kinase." *J Cell Sci* 114(Pt 6): 1221-7.
- Schewe, D. M. and J. A. Aguirre-Ghiso (2008). "ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30): 10519-24.
- Schmidt, A. and A. Hall (2002). "Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch." *Genes Dev* 16(13): 1587-609.
- Schnelzer, A., D. Prechtel, et al. (2000). "Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b." *Oncogene* 19(26): 3013-20.
- Schrantz, N., M. F. Bourgeade, et al. (2001). "p38-mediated regulation of an Fas-associated death domain protein-independent pathway leading to caspase-8 activation during TGFbeta-induced apoptosis in human Burkitt lymphoma B cells BL41." *Mol Biol Cell* 12(10): 3139-51.
- Schroeder, R., E. London, et al. (1994). "Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25): 12130-4.
- Schwartz, M. A. and M. H. Ginsberg (2002). "Networks and crosstalk: integrin signalling spreads." *Nat Cell Biol* 4(4): E65-8.
- Scita, G., J. Nordstrom, et al. (1999). "EPS8 and E3B1 transduce signals from Ras to Rac." *Nature* 401(6750): 290-3.
- Sells, M. A., U. G. Knaus, et al. (1997). "Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells." *Curr Biol* 7(3): 202-10.
- Sen, P., P. K. Chakraborty, et al. (2005). "p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) upregulates catalase levels in response to low dose H₂O₂ treatment through enhancement of mRNA stability." *FEBS Lett* 579(20): 4402-6.
- Shapiro, L. and C. A. Dinarello (1995). "Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(26): 12230-4.
- Shin, I., S. Kim, et al. (2005). "H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells." *J Biol Chem* 280(15): 14675-83.
- Shiroto, K., H. Otani, et al. (2005). "MK2-/- gene knockout mouse hearts carry anti-apoptotic signal and are resistant to ischemia reperfusion injury." *J Mol Cell Cardiol* 38(1): 93-7.
- Shivakrupa, R., V. Radha, et al. (2003). "Physical and functional interaction between Hck tyrosine kinase and guanine nucleotide exchange factor C3G results in apoptosis, which is independent of C3G catalytic domain." *J Biol Chem* 278(52): 52188-94.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* 387(6633): 569-72.
- Stork, P. J. (2005). "Directing NGF's actions: it's a Rap." *Nat Cell Biol* 7(4): 338-9.
- Sumbayev, V. V. and I. M. Yasinska (2005). "Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species." *Arch Biochem Biophys* 436(2): 406-12.
- Suzuoki, M., M. Miyamoto, et al. (2002). "Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Br J Cancer* 87(10): 1140-4.

- Swat, A., I. Dolado, et al. (2009). "Cell density-dependent inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by p38alpha mitogen-activated protein kinase via Sprouty2 downregulation." *Mol Cell Biol* 29(12): 3332-43.
- Tamura, K., T. Sudo, et al. (2000). "Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis." *Cell* 102(2): 221-31.
- Tanaka, N., M. Kamanaka, et al. (2002). "Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis." *EMBO Rep* 3(8): 785-91.
- Tanaka, S., T. Morishita, et al. (1994). "C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8): 3443-7.
- Tanaka, S., T. Ouchi, et al. (1997). "Downstream of Crk adaptor signaling pathway: activation of Jun kinase by v-Crk through the guanine nucleotide exchange protein C3G." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2356-61.
- Tobiume, K., A. Matsuzawa, et al. (2001). "ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis." *EMBO Rep* 2(3): 222-8.
- Uhlik, M. T., A. N. Abell, et al. (2003). "Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock." *Nat Cell Biol* 5(12): 1104-10.
- Vadlamudi, R. K., F. Li, et al. (2002). "Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1." *Nat Cell Biol* 4(9): 681-90.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* 160(1): 1-40.
- Valladares, A., A. M. Alvarez, et al. (2000). "p38 mitogen-activated protein kinase mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in rat fetal brown adipocytes." *Endocrinology* 141(12): 4383-95.
- Valladares, A., C. Roncero, et al. (2001). "TNF-alpha inhibits UCP-1 expression in brown adipocytes via ERKs. Opposite effect of p38MAPK." *FEBS Lett* 493(1): 6-11.
- Valles, A. M., M. Beuvin, et al. (2004). "Activation of Rac1 by paxillin-Crk-DOCK180 signaling complex is antagonized by Rap1 in migrating NBT-II cells." *J Biol Chem* 279(43): 44490-6.
- Van Laethem, A., S. Van Kelst, et al. (2004). "Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes." *Faseb J* 18(15): 1946-8.
- Vanhaesebroeck, B. and D. R. Alessi (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." *Biochem J* 346 Pt 3: 561-76.
- Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." *Science* 294(5545): 1299-304.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer* 2(7): 489-501.
- Voss, A. K., D. L. Krebs, et al. (2006). "C3G regulates the size of the cerebral cortex neural precursor population." *EMBO J* 25(15): 3652-63.
- Voss, A. K., P. Gruss, et al. (2003). "The guanine nucleotide exchange factor C3G is necessary for the formation of focal adhesions and vascular maturation." *Development* 130(2): 355-67.
- Wang, W. H., G. Gregori, et al. (2004). "Sustained activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase pathways by hepatitis B virus X protein mediates apoptosis via induction of Fas/FasL and tumor necrosis

- factor (TNF) receptor 1/TNF- α expression." *Mol Cell Biol* 24(23): 10352-65.
- Wang, X., J. L. Martindale, et al. (1998). "The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival." *Biochem J* 333 (Pt 2): 291-300.
 - Wang, Y., S. Huang, et al. (1998). "Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family." *J Biol Chem* 273(4): 2161-8.
 - Welch, H. C., W. J. Coadwell, et al. (2003). "Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac." *FEBS Lett* 546(1): 93-7.
 - Wennerberg, K. and C. J. Der (2004). "Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)." *J Cell Sci* 117(Pt 8): 1301-12.
 - Weston, C. R. and R. J. Davis (2007). "The JNK signal transduction pathway." *Curr Opin Cell Biol* 19(2): 142-9.
 - Wherlock, M. and H. Mellor (2002). "The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story." *J Cell Sci* 115(Pt 2): 239-40.
 - Williams, T. M. and M. P. Lisanti (2004). "The caveolin proteins." *Genome Biol* 5(3): 214.
 - Woo, C. H. and J. H. Kim (2002). "Rac GTPase activity is essential for lipopolysaccharide signaling to extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase activation in rat-2 fibroblasts." *Mol Cells* 13(3): 470-5.
 - Woodman, S. E., D. S. Park, et al. (2002). "Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade." *J Biol Chem* 277(41): 38988-97.
 - Woodside, D. G., A. Obergfell, et al. (2001). "Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains." *Curr Biol* 11(22): 1799-804.
 - Xu, Q., Y. Karouji, et al. (2003). "The PI 3-kinase-Rac-p38 MAP kinase pathway is involved in the formation of signet-ring cell carcinoma." *Oncogene* 22(36): 5537-44.
 - Yamada, E. (1955). "The fine structure of the renal glomerulus of the mouse." *J Biophys Biochem Cytol* 1(6): 551-66.
 - Yamamoto, M., Y. Toya, et al. (1998). "Caveolin is an activator of insulin receptor signaling." *J Biol Chem* 273(41): 26962-8.
 - Yang, Q. and K. L. Guan (2007). "Expanding mTOR signaling." *Cell Res* 17(8): 666-81.
 - York, R. D., H. Yao, et al. (1998). "Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor." *Nature* 392(6676): 622-6.
 - Yuan, T. L. and L. C. Cantley (2008). "PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme." *Oncogene* 27(41): 5497-510.
 - Zarubin, T. and J. Han (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway." *Cell Res* 15(1): 11-8.
 - Zechner, D., R. Craig, et al. (1998). "MKK6 activates myocardial cell NF- κ B and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner." *J Biol Chem* 273(14): 8232-9.
 - Zhang, J. and P. A. Ney (2009). "Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy." *Cell Death Differ* 16(7): 939-46.
 - Zhang, L., L. Li, et al. (2009). "BNIP3 mediates cell death by different pathways following localization to endoplasmic reticulum and mitochondrion." *FASEB J*.

- Zhuang, S., J. T. Demirs, et al. (2000). "p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide." *J Biol Chem* 275(34): 25939-48.
- Zuluaga, S., A. Alvarez-Barrientos, et al. (2007). "Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1." *Cell Signal* 19(1): 62-74.
- Zuluaga, S., A. Gutierrez-Uzquiza, et al. (2007). "p38alpha MAPK can positively or negatively regulate Rac-1 activity depending on the presence of serum." *FEBS Lett* 581(20): 3819-25.
- Zwartkruis, F. J. and J. L. Bos (1999). "Ras and Rap1: two highly related small GTPases with distinct function." *Exp Cell Res* 253(1): 157-65.

Anexo I

1. ARRAYS DE EXPRESIÓN MEFS wt/p38α -/-

Regulación diferencial de genes entre wt y p38α -/- MEFs. Se representa el número de veces se expresa ese gen en las células p38α -/- respecto a las wt*.

Gen	Descripción	Ensembl Gene ID	Nº de veces
2310030G06 Rik	Uncharacterized protein C11orf52 homolog [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9D8L0]	ENSMUSG00000032062	2
3830403N18 Rik	Xlr-like [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_081786]	ENSMUSG00000031125	4
4930519F16 Rik	Novel gene likely coding for a serine proteases, trypsin family/Chymotrypsin serine protease family (S1) containing proteinMCG55901Ppnx protein ;; [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8K3S0]	ENSMUSG00000031325	2
Abcb1a	Multidrug resistance protein 3 (EC 3.6.3.44)(ATP-binding cassette sub-family B member 1A)(P-glycoprotein 3)(MDR1A) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P21447]	ENSMUSG00000040584	5
Abcb1a	Multidrug resistance protein 3 (EC 3.6.3.44)(ATP-binding cassette sub-family B member 1A)(P-glycoprotein 3)(MDR1A) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P21447]	ENSMUSG00000040584	4
Adamts5	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 Precursor (ADAMTS-5)(ADAM-TS 5)(ADAM-TS5)(EC 3.4.24.-)(Aggrecanase-2)(ADMP-2)(Implantin) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9R001]	ENSMUSG00000022894	-2
Adrb2	Beta-2 adrenergic receptor (Beta-2 adrenoreceptor)(Beta-2 adrenoreceptor) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P18762]	ENSMUSG00000045730	2
Agtr2	Type-2 angiotensin II receptor (AT2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P35374]	ENSMUSG00000068122	2
Atp1a2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2 Precursor (Sodium pump subunit alpha-2)(EC 3.6.3.9)(Na(+)/K(+) ATPase alpha-2 subunit)(Na(+)/K(+) ATPase alpha(+) subunit) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q6PIE5]	ENSMUSG00000007097	2
Aut2	autism susceptibility candidate 2 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_796021]	ENSMUSG00000029673	2
Bdh1	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial Precursor (BDH)(EC 1.1.1.30)(3-hydroxybutyrate dehydrogenase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q80XN0]	ENSMUSG00000046598	-2
C1ql3	Complement C1q-like protein 3 Precursor (Gliacolin) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ESN4]	ENSMUSG00000049630	-2
Cadm1	Cell adhesion molecule 1 Precursor (Immunoglobulin superfamily member 4)(Nectin-like protein 2)(NECL-2)(Tumor suppressor in lung cancer 1)(TSLC-1)(Synaptic cell adhesion molecule)(Spermatogenic immunoglobulin superfamily)(SgIGSF) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8R5M8]	ENSMUSG00000032076	-2
Cbr2	Carbonyl reductase [NADPH] 2 (EC 1.1.1.184)(NADPH-dependent carbonyl reductase 2)(Lung carbonyl reductase)(LCR)(Adipocyte protein P27)(AP27) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P08074]	ENSMUSG00000025150	3
Ccl9	C-C motif chemokine 9 Precursor (Small-inducible cytokine A9)(Macrophage inflammatory protein 1-gamma)(MIP-1-gamma)(Macrophage inflammatory protein-related protein 2)(MRP-2)(CCF18) [Contains CCL9(29-101);CCL9(30-101);CCL9(31-101)] [Source:UniProtKB/Swiss-	ENSMUSG00000019122	-2

Cd200	OX-2 membrane glycoprotein Precursor (MRC OX-2 antigen)(CD200 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O54901]	ENSMUSG00000022661	-3
Cd24a	Signal transducer CD24 Precursor (M1/69-J11D heat stable antigen)(HSA)(Nectadrin)(Lymphocyte antigen 52)(Ly-52)(X62 heat stable antigen)(R13-Ag)(CD24 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P24807]	ENSMUSG00000047139	5
Cd24a	Signal transducer CD24 Precursor (M1/69-J11D heat stable antigen)(HSA)(Nectadrin)(Lymphocyte antigen 52)(Ly-52)(X62 heat stable antigen)(R13-Ag)(CD24 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P24807]	ENSMUSG00000047139	5
Cdkn2b	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B (p14-INK4b)(p15-INK4b) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P55271]	ENSMUSG00000073802	2
Cdo1	Cysteine dioxygenase type 1 (EC 1.13.11.20)(Cysteine dioxygenase type I)(CDO-I)(CDO) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P60334]	ENSMUSG00000033022	2
Col14a1	Collagen alpha-1(XIV) chain Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q80X19]	ENSMUSG00000022371	2
Crabp1	Cellular retinoic acid-binding protein 1 (Cellular retinoic acid-binding protein I)(CRABP-I) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P62965]	ENSMUSG00000032291	-4
Crabp2	Cellular retinoic acid-binding protein 2 (Cellular retinoic acid-binding protein II)(CRABP-II) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P22935]	ENSMUSG00000004885	4
Ctsc	Dipeptidyl-peptidase 1 Precursor (EC 3.4.14.1)(Dipeptidyl-peptidase I)(DPP-I)(DPPI)(Cathepsin C)(Cathepsin J)(Dipeptidyl transferase) [Contains Dipeptidyl-peptidase 1 exclusion domain chain(Dipeptidyl-peptidase I exclusion domain chain);Dipeptidyl-peptidase 1 heavy chain(Dipeptidyl-peptidase I heavy chain);Dipeptidyl-peptidase 1 light chain(Dipeptidyl-peptidase I light chain)] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P97821]	ENSMUSG00000030560	2
Cxcl2	C-X-C motif chemokine 2 Precursor (Macrophage inflammatory protein 2)(MIP2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P10889]	ENSMUSG00000058427	2
Cyba	Cytochrome b-245 light chain (p22 phagocyte B-cytochrome)(Neutrophil cytochrome b 22 kDa polypeptide)(p22-phox)(p22phox)(Cytochrome b(558) alpha chain)(Cytochrome b558 subunit alpha)(Superoxide-generating NADPH oxidase light chain subunit) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61462]	ENSMUSG00000006519	2
Cyp7b1	25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase (Oxysterol 7-alpha-hydroxylase)(EC 1.14.13.100)(Cytochrome P450 7B1)(HCT-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q60991]	ENSMUSG00000039519	2
Depdc6	DEP domain-containing protein 6 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q570Y9]	ENSMUSG00000022419	2
Dkk3	Dickkopf-related protein 3 Precursor (Dickkopf-3)(Dkk-3)(mDkk-3) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9QUN9]	ENSMUSG00000030772	2
Dkk3	Dickkopf-related protein 3 Precursor (Dickkopf-3)(Dkk-3)(mDkk-3) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9QUN9]	ENSMUSG00000030772	2
Dlk1	Protein delta homolog 1 Precursor (DLK-1)(Preadipocyte factor 1)(Pref-1)(Adipocyte differentiation inhibitor protein) [Contains Fetal antigen 1(FA1)] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q09163]	ENSMUSG00000040856	-3
Dmd	Dystrophin [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P11531]	ENSMUSG00000045103	2
Dmd	Dystrophin [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P11531]	ENSMUSG00000045103	2

Ear11	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 11 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_444343]	ENSMUSG00000047222	-2
Ebf1	Transcription factor COE1 (O/E-1)(OE-1)(Early B-cell factor) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q07802]	ENSMUSG00000057098	-2
Efemp1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 Precursor (Fibulin-3)(FIBL-3) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BPB5]	ENSMUSG00000020467	6
Ehd3	EH domain-containing protein 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9QXY6]	ENSMUSG00000024065	2
Elavl2	ELAV-like protein 2 (Hu-antigen B)(HuB)(ELAV-like neuronal protein 1)(Nervous system-specific RNA-binding protein Mel-N1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q60899]	ENSMUSG00000008489	2
Enpp3	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3 (E-NPP 3)(Phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase 3)(Phosphodiesterase I beta)(PD-Ibeta)(CD203c antigen) [Includes Alkaline phosphodiesterase I(EC 3.1.4.1);Nucleotide pyrophosphatase(NPPase)(EC 3.6.1.9)] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q6DYE8]	ENSMUSG00000019989	2
Epha3	Ephrin type-A receptor 3 Precursor (EC 2.7.10.1)(Tyrosine-protein kinase receptor ETK1)(MEK4)(Tyrosine-protein kinase TYRO4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P29319]	ENSMUSG00000052504	-2
Epha7	Ephrin type-A receptor 7 Precursor (EC 2.7.10.1)(Tyrosine-protein kinase receptor EHK-3)(EPH homology kinase 3)(Embryonic brain kinase)(EBK)(Developmental kinase 1)(MDK-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61772]	ENSMUSG00000028289	2
Fah	Fumarylacetoacetase (FAA)(EC 3.7.1.2)(Fumarylacetoacetate hydrolase)(Beta-diketonase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P35505]	ENSMUSG00000030630	2
Fbln1	Fibulin-1 Precursor (FIBL-1)(Basement-membrane protein 90)(BM-90) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q08879]	ENSMUSG00000006369	2
Fhl1	Four and a half LIM domains protein 1 (FHL-1)(Skeletal muscle LIM-protein 1)(SLIM 1)(SLIM)(KyoT)(RBP-associated molecule 14-1)(RAM14-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P97447]	ENSMUSG00000023092	3
Fmod	Fibromodulin Precursor (FM)(Collagen-binding 59 kDa protein)(Keratan sulfate proteoglycan fibromodulin)(KSPG fibromodulin) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P50608]	ENSMUSG00000041559	3
Fmod	Fibromodulin Precursor (FM)(Collagen-binding 59 kDa protein)(Keratan sulfate proteoglycan fibromodulin)(KSPG fibromodulin) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P50608]	ENSMUSG00000041559	3
Fndc1	fibronectin type III domain containing 1 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001074885]	ENSMUSG00000071984	2
Gnai1	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 1 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_034435]	ENSMUSG00000057614	-2
Gnrhr	Gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH receptor)(GnRH-R) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q01776]	ENSMUSG00000029255	2
Gpm6b	Neuronal membrane glycoprotein M6-b (M6b) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P35803]	ENSMUSG00000031342	4
Grb10	Growth factor receptor-bound protein 10 (GRB10 adapter protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q60760]	ENSMUSG00000020176	2
Gsn	Gelsolin Precursor (Actin-depolymerizing factor)(ADF)(Brevin) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P13020]	ENSMUSG00000026879	3
Hcn1	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 (Brain cyclic nucleotide-gated channel 1)(BCNG-1)(Hyperpolarization-activated cation channel 2)(HAC-2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O88704]	ENSMUSG00000021730	-2

Hoxa10	Homeobox protein Hox-A10 (Hox-1.8) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P31310]	ENSMUSG00000000938	4
Hoxa11	Homeobox protein Hox-A11 (Hox-1.9) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P31311]	ENSMUSG000000038210	2
Id4	DNA-binding protein inhibitor ID-4 (Inhibitor of DNA binding 4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P41139]	ENSMUSG000000021379	-3
Ifi203	Interferon-activable protein 203 (Interferon-inducible protein p203)(Ifi-203) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O35368]	ENSMUSG000000039997	-2
Ifi203	Interferon-activable protein 203 (Interferon-inducible protein p203)(Ifi-203) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O35368]	ENSMUSG000000039997	-2
Igf1	Insulin-like growth factor I Precursor (IGF-I)(Somatomedin) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P05017]	ENSMUSG000000020053	2
Igf1	Insulin-like growth factor I Precursor (IGF-I)(Somatomedin) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P05017]	ENSMUSG000000020053	2
Il1rn	Interleukin-1 receptor antagonist protein Precursor (IL-1ra)(IL-1RN)(IRAP)(IL1 inhibitor) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P25085]	ENSMUSG000000026981	2
Il1rn	Interleukin-1 receptor antagonist protein Precursor (IL-1ra)(IL-1RN)(IRAP)(IL1 inhibitor) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P25085]	ENSMUSG000000026981	2
Irx2	Iroquois-class homeodomain protein IRX-2 (Iroquois homeobox protein 2)(Homeodomain protein IRXA2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P81066]	ENSMUSG000000001504	-2
Itm2a	Integral membrane protein 2A (E25 protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61500]	ENSMUSG000000031239	3
Itm2a	Integral membrane protein 2A (E25 protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61500]	ENSMUSG000000031239	3
Kcnh2	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2 (Voltage-gated potassium channel subunit Kv11.1)(Ether-a-go-go-related gene potassium channel 1)(ERG1)(Merg1)(MERG)(Ether-a-go-go-related protein 1)(Eag-related protein 1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O35219]	ENSMUSG000000038319	2
Klhl13	Kelch-like protein 13 (BTB and kelch domain-containing protein 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q80TF4]	ENSMUSG000000036782	2
Krt19	Keratin, type I cytoskeletal 19 (Cytokeratin-19)(CK-19)(Keratin-19)(K19) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P19001]	ENSMUSG000000020911	2
Lama2	Laminin subunit alpha-2 Precursor (Laminin M chain)(Merosin heavy chain) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q60675]	ENSMUSG000000019899	2
Ldb3	LIM domain-binding protein 3 (Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein)(Protein cypher)(Protein oracle) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9JKS4]	ENSMUSG000000021798	2
Limch1	LIM and calponin homology domains-containing protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q3UH68]	ENSMUSG000000037736	2
Loxl2	Lysyl oxidase homolog 2 Precursor (EC 1.4.3.-)(Lysyl oxidase-like protein 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P58022]	ENSMUSG000000034205	2
Lrrtm1	Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 1 Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8K377]	ENSMUSG000000060780	-3
Mab21l1	Protein mab-21-like 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O70299]	ENSMUSG000000056947	3
Mab21l1	Protein mab-21-like 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O70299]	ENSMUSG000000056947	2
Myi9	Myosin regulatory light polypeptide 9 (Myosin regulatory light chain 9)(Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CQ19]	ENSMUSG000000067818	2

Naalad2	N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase 2 (EC 3.4.17.21)(N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase II)(NAALADase II)(Glutamate carboxypeptidase III)(GCP III)(N-acetylaspartylglutamate peptidase II)(NAAG-peptidase II) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CZR2]	ENSMUSG00000043943	2
Naip4	Baculoviral IAP repeat-containing protein 1a (Neuronal apoptosis inhibitory protein 1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9QWK5]	ENSMUSG00000021640	2
Nap1l2	Nucleosome assembly protein 1-like 2 (Brain-specific protein, X-linked) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P51860]	ENSMUSG00000082229	2
Npnt	Nephronectin Precursor (Preosteoblast EGF-like repeat protein with MAM domain) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q91V88]	ENSMUSG00000040998	2
Npy1r	Neuropeptide Y receptor type 1 (NPY1-R) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q04573]	ENSMUSG00000036437	2
Nsg1	Neuron-specific protein family member 1 (Brain neuron cytoplasmic protein 1)(p21)(M234) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62092]	ENSMUSG00000029126	2
Oas1a	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1A ((2'-5')oligo(A) synthetase 1A)(2-5A synthetase 1A)(EC 2.7.7.-)(p42 OAS) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P11928]	ENSMUSG00000052776	-2
Oas1g	2'-5' oligoadenylate synthetase 1G [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_035982]	ENSMUSG00000066861	-2
Otor	Otoraplin Precursor (Melanoma inhibitory activity-like protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9JIE3]	ENSMUSG00000027416	2
Parp14	Poly [ADP-ribose] polymerase 14 (PARP-14)(EC 2.4.2.30)(Collaborator of STAT6)(CoaSt6) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q2EMV9]	ENSMUSG00000034422	-2
Pcdhb7	protocadherin beta 7 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_444362]	ENSMUSG00000045062	3
Pcdhb9	protocadherin beta 9 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_444364]	ENSMUSG00000051242	4
Pdgfd	Platelet-derived growth factor D Precursor (PDGF-D)(Spinal cord-derived growth factor B)(SCDGF-B) [Contains Platelet-derived growth factor D, latent form(PDGFD latent form);Platelet-derived growth factor D, receptor-binding form(PDGFD receptor-binding form)] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q92517]	ENSMUSG00000032006	3
Perp	p53 apoptosis effector related to PMP-22 (Keratinocyte-associated protein 1)(KCP-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9JK95]	ENSMUSG00000019851	2
Pitx1	Pituitary homeobox 1 (Paired-like homeodomain transcription factor 1)(Homeobox protein PITX1)(Homeobox protein P-OTX)(Pituitary OTX-related factor)(Hindlimb-expressed homeobox protein backfoot) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P70314]	ENSMUSG00000021506	2
Plac8	Placenta-specific gene 8 protein (Protein C15)(Onzin) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9JL48]	ENSMUSG00000029322	-2
Popdc3	Popeye domain-containing protein 3 (Popeye protein 3) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ES81]	ENSMUSG00000019848	2
Prokr1	Prokineticin receptor 1 (PK-R1)(G-protein coupled receptor 73) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9JKL1]	ENSMUSG00000049409	2
Psmb8	Proteasome subunit beta type-8 Precursor (EC 3.4.25.1)(Proteasome subunit beta-5i)(Proteasome component C13)(Macropain subunit C13)(Multicatalytic endopeptidase complex subunit C13) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P28063]	ENSMUSG00000024338	-2

Qpct	Glutaminyl-peptide cyclotransferase Precursor (EC 2.3.2.5)(Glutaminyl-tRNA cyclotransferase)(Glutaminyl cyclase)(QC) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CYK2]	ENSMUSG00000024084	2
Reep1	Receptor expression-enhancing protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BGH4]	ENSMUSG00000052852	-2
Rgs4	Regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O08899]	ENSMUSG00000038530	2
RP23-3G8.1		ENSMUSG00000081937	4
Rspo2	R-spondin-2 Precursor (Roof plate-specific spondin-2)(Cysteine-rich and single thrombospondin domain-containing protein 2)(Cristin-2)(mCristin-2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BFU0]	ENSMUSG00000051920	3
Rtp4	Receptor-transporting protein 4 (28 kDa interferon-responsive protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ER80]	ENSMUSG00000033355	-2
Scara5	Scavenger receptor class A member 5 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8K299]	ENSMUSG00000022032	-2
Scrq1	Scrapie-responsive protein 1 Precursor (ScRG-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O88745]	ENSMUSG00000031610	2
Sema5a	Semaphorin-5A Precursor (Semaphorin-F)(Sema F) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62217]	ENSMUSG00000022231	2
Serp1b1a	Leukocyte elastase inhibitor A (Serine protease inhibitor EIA)(Serpin B1a) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9D154]	ENSMUSG00000044734	2
Sfrp2	Secreted frizzled-related protein 2 Precursor (sFRP-2)(Secreted apoptosis-related protein 1)(SARP-1)(SDF5 protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P97299]	ENSMUSG00000027996	2
Shisa2	Protein shisa-2 homolog Precursor (Shisa-like protein 2)(mShisa)(Transmembrane protein 46) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8QZV2]	ENSMUSG00000044461	2
Shisa2	Protein shisa-2 homolog Precursor (Shisa-like protein 2)(mShisa)(Transmembrane protein 46) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8QZV2]	ENSMUSG00000044461	2
Slc1a6	Excitatory amino acid transporter 4 (Sodium-dependent glutamate/aspartate transporter)(High-affinity neuronal glutamate transporter)(Solute carrier family 1 member 6) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O35544]	ENSMUSG00000005357	3
Slc35a2	UDP-galactose translocator (UDP-galactose transporter)(UDP-Gal-Tr)(UGT)(mUGT1)(Solute carrier family 35 member A2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9R0M8]	ENSMUSG00000031156	2
Slc7a2	Low affinity cationic amino acid transporter 2 (CAT-2)(CAT2)(Solute carrier family 7 member 2)(T-cell early activation protein)(TEA)(20.5) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P18581]	ENSMUSG00000031596	2
Smpd3a	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a Precursor (ASM-like phosphodiesterase 3a)(EC 3.1.4.-) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P70158]	ENSMUSG00000019872	3
Snx10	Sorting nexin-10 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CWT3]	ENSMUSG00000038301	-2
Speg	Striated muscle-specific serine/threonine-protein kinase (EC 2.7.11.1)(Aortic preferentially expressed protein 1)(APEG-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62407]	ENSMUSG00000026207	2
Stmn2	Stathmin-2 (Superior cervical ganglion-10 protein)(Protein SCG10) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P55821]	ENSMUSG00000027500	4
Stmn2	Stathmin-2 (Superior cervical ganglion-10 protein)(Protein SCG10) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P55821]	ENSMUSG00000027500	2
Tnfrsf11b	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B Precursor (Osteoprotegerin)(Osteoclastogenesis inhibitory factor) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O08712]	ENSMUSG00000063727	4

Tnnt2	Troponin T, cardiac muscle (TnTc)(Cardiac muscle troponin T)(cTnT) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P50752]	ENSMUSG00000026414	-3
Tnnt2	Troponin T, cardiac muscle (TnTc)(Cardiac muscle troponin T)(cTnT) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P50752]	ENSMUSG00000026414	-4
Trim30	Tripartite motif-containing protein 30 (Down regulatory protein of interleukin-2 receptor) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P15533]	ENSMUSG00000030921	-2
Vnn1	Pantetheinase Precursor (EC 3.5.1.92)(Pantetheine hydrolase)(Vascular non-inflammatory molecule 1)(Vanin-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9Z0K8]	ENSMUSG00000037440	4
Xlr	X-linked lymphocyte-regulated protein PM1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P05531]	ENSMUSG00000054626	4

* El valor de Log 2 ratio se ha categorizado.

2. ARRAYS DE EXPRESIÓN MEFS wt/C3Gi

Regulación diferencial de genes entre wt y C3Gi. Se representa el número de veces se expresa ese gen en las células wt respecto a las C3Gi.

Gen	Descripción	Ensembl Gene ID	Nº de veces
1190002H23Rik	Response gene to complement 32 protein (RGC-32) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9DBX1]	ENSMUSG00000022018	3
1810011O10Rik	Uncharacterized protein C8orf4 homolog [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9D915]	ENSMUSG00000056313	4
2210023G05Rik	hypothetical protein LOC72361 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_932116]	ENSMUSG00000031877	-4
3830403N18Rik	Xlr-like [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_081786]	ENSMUSG00000031125	3
4632428N05Rik	Platelet receptor Gi24 Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9D659]	ENSMUSG00000020101	2
AC099696.12		ENSMUSG00000073674	2
AC103620.1		ENSMUSG00000081441	2
AC103620.12		ENSMUSG00000067880	2
AC147806.5-1		ENSMUSG00000079452	-3
AC147806.5-1		ENSMUSG00000079452	-3
AC147806.5-1		ENSMUSG00000079452	-2
AC167036.6-1		ENSMUSG00000073632	-3
AC167036.6-1		ENSMUSG00000073632	-2
Acsf6	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 6 (EC 6.2.1.3)(Long-chain acyl-CoA synthetase 6)(LACS 6) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q91WC3]	ENSMUSG00000020333	2
Adhfe1	Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, mitochondrial Precursor (HOT)(EC 1.1.99.24)(Alcohol dehydrogenase iron-containing protein 1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8R0N6]	ENSMUSG00000025911	2
Adm	ADM Precursor [Contains Adrenomedullin(AM);Proadrenomedullin N-20 terminal peptide(ProAM N-terminal 20 peptide)(ProAM-N20)(PAMP)] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P97297]	ENSMUSG00000030790	6
Aim2	Interferon-inducible protein AIM2 (Interferon-inducible protein p210)(Ifi-210) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q91VJ1]	ENSMUSG00000037860	3
Akr1b3	Aldose reductase (AR)(EC 1.1.1.21)(Aldehyde reductase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P45376]	ENSMUSG00000001642	2
AL646055.10		ENSMUSG00000073040	2
AL671861.13		ENSMUSG00000067829	-2
Angptl4	Angiopoietin-related protein 4 Precursor (Angiopoietin-like 4)(Hepatic fibrinogen/angiopoietin-related protein)(HFARP)(Fasting-induced adipose factor)(Secreted protein Bk89)(425O18-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9Z1P8]	ENSMUSG00000002289	2
Ank3	ankyrin 3, epithelial isoform b [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_666117]	ENSMUSG00000069601	2
Apol9b	apolipoprotein L 9b [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_776104]	ENSMUSG00000057346	-2
Apol9b	Apol9a protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8VDU3]	ENSMUSG00000068246	-2
Ar	Androgen receptor (Dihydrotestosterone receptor)(Nuclear receptor subfamily 3 group C member 4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P19091]	ENSMUSG00000046532	-2
Arap2	Arf-GAP, Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 (Centaurin-delta-1)(Cnt-d1)	ENSMUSG00000037999	2

[Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BZ05]

Areg	Amphiregulin Precursor (AR)(Schwannoma-derived growth factor)(SDGF) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P31955]	ENSMUSG00000029378	5
Arg2	Arginase-2, mitochondrial Precursor (Arginase II)(EC 3.5.3.1)(Non-hepatic arginase)(Kidney-type arginase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O08691]	ENSMUSG00000021125	3
Atp1a3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 (Sodium pump subunit alpha-3)(EC 3.6.3.9)(Na(+)/K(+) ATPase alpha-3 subunit)(Na(+)/K(+) ATPase alpha(III) subunit) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q6PIC6]	ENSMUSG00000040907	2
Bicc1	Protein bicaudal C homolog 1 (Bic-C) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q99MQ1]	ENSMUSG00000014329	2
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O55003]	ENSMUSG00000078566	1,9
Brunol4	CUG-BP- and ETR-3-like factor 4 (CELF-4)(Bruno-like protein 4)(RNA-binding protein BRUNOL-4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q7TSY6]	ENSMUSG00000024268	2
Bst1	ADP-ribosyl cyclase 2 Precursor (EC 3.2.2.5)(Cyclic ADP-ribose hydrolase 2)(cADPr hydrolase 2)(Bone marrow stromal antigen 1)(BST-1)(BP-3 alloantigen)(Antigen BP3)(Leukocyte antigen 65)(Ly-65)(CD157 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q64277]	ENSMUSG00000029082	3
Bst1	ADP-ribosyl cyclase 2 Precursor (EC 3.2.2.5)(Cyclic ADP-ribose hydrolase 2)(cADPr hydrolase 2)(Bone marrow stromal antigen 1)(BST-1)(BP-3 alloantigen)(Antigen BP3)(Leukocyte antigen 65)(Ly-65)(CD157 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q64277]	ENSMUSG00000029082	3
Cadm4	Cell adhesion molecule 4 Precursor (Immunoglobulin superfamily member 4C)(Nectin-like protein 4)(TSLC1-like protein 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8R464]	ENSMUSG00000054793	2
Card10	Caspase recruitment domain-containing protein 10 (Bcl10-interacting MAGUK protein 1)(Bimp1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P58660]	ENSMUSG00000033170	2
Cd200	OX-2 membrane glycoprotein Precursor (MRC OX-2 antigen)(CD200 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O54901]	ENSMUSG00000022661	-2
Cd24a	Signal transducer CD24 Precursor (M1/69-J11D heat stable antigen)(HSA)(Nectadrin)(Lymphocyte antigen 52)(Ly-52)(X62 heat stable antigen)(R13-Ag)(CD24 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P24807]	ENSMUSG00000047139	7
Cd24a	Signal transducer CD24 Precursor (M1/69-J11D heat stable antigen)(HSA)(Nectadrin)(Lymphocyte antigen 52)(Ly-52)(X62 heat stable antigen)(R13-Ag)(CD24 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P24807]	ENSMUSG00000047139	5
Cd24a	Signal transducer CD24 Precursor (M1/69-J11D heat stable antigen)(HSA)(Nectadrin)(Lymphocyte antigen 52)(Ly-52)(X62 heat stable antigen)(R13-Ag)(CD24 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P24807]	ENSMUSG00000047139	4
Cd97	CD97 antigen Precursor (CD97 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9Z0M6]	ENSMUSG00000002885	4
Cdh2	Cadherin-2 Precursor (Neural cadherin)(N-cadherin)(CD325 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P15116]	ENSMUSG00000024304	-2
Cdo1	Cysteine dioxygenase type 1 (EC 1.13.11.20)(Cysteine dioxygenase type I)(CDO-I)(CDO) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P60334]	ENSMUSG00000033022	2
Ch25h	Cholesterol 25-hydroxylase (EC 1.14.99.38)(Cholesterol 25-monooxygenase)(m25OH) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9Z0F5]	ENSMUSG00000050370	3

Chrn1	Acetylcholine receptor subunit beta Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P09690]	ENSMUSG00000041189	2
Clca1	chloride channel calcium activated 1 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_034029]	ENSMUSG00000056025	5
Clca1	chloride channel calcium activated 1 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_034029]	ENSMUSG00000056025	3
Clca2	chloride channel calcium activated 2 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_085104]	ENSMUSG00000028262	5
Clip4	CAP-Gly domain-containing linker protein 4 (Restin-like protein 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8C196]	ENSMUSG00000024059	2
Clu	Clusterin Precursor (Sulfated glycoprotein 2)(SGP-2)(Clustrin)(Apolipoprotein J)(Apo-J) [Contains Clusterin beta chain;Clusterin alpha chain] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q06890]	ENSMUSG00000022037	4
Clu	Clusterin Precursor (Sulfated glycoprotein 2)(SGP-2)(Clustrin)(Apolipoprotein J)(Apo-J) [Contains Clusterin beta chain;Clusterin alpha chain] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q06890]	ENSMUSG00000022037	3
Clu	Clusterin Precursor (Sulfated glycoprotein 2)(SGP-2)(Clustrin)(Apolipoprotein J)(Apo-J) [Contains Clusterin beta chain;Clusterin alpha chain] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q06890]	ENSMUSG00000022037	3
Clu	Clusterin Precursor (Sulfated glycoprotein 2)(SGP-2)(Clustrin)(Apolipoprotein J)(Apo-J) [Contains Clusterin beta chain;Clusterin alpha chain] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q06890]	ENSMUSG00000022037	3
Cmpk2	UMP-CMP kinase 2, mitochondrial Precursor (EC 2.7.4.14)(Thymidylate kinase LPS-inducible member)(TYKi) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q3U5Q7]	ENSMUSG00000020638	-2
Cp	Ceruloplasmin Precursor (EC 1.16.3.1)(Ferroxidase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61147]	ENSMUSG00000003617	4
Cp	Ceruloplasmin Precursor (EC 1.16.3.1)(Ferroxidase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61147]	ENSMUSG00000003617	3
Cp	Ceruloplasmin Precursor (EC 1.16.3.1)(Ferroxidase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61147]	ENSMUSG00000003617	3
Cp	Ceruloplasmin Precursor (EC 1.16.3.1)(Ferroxidase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61147]	ENSMUSG00000003617	3
Cp	Ceruloplasmin Precursor (EC 1.16.3.1)(Ferroxidase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61147]	ENSMUSG00000003617	3
Crabp1	Cellular retinoic acid-binding protein 1 (Cellular retinoic acid-binding protein I)(CRABP-I) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P62965]	ENSMUSG00000032291	2
Crct1	cysteine-rich C-terminal 1 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_083074]	ENSMUSG00000027913	4
Crot	Peroxisomal carnitine O-octanoyltransferase (COT)(EC 2.3.1.137) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9DC50]	ENSMUSG00000003623	-2
Csprs	predicted gene, EG665378 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001075215]	ENSMUSG00000079457	-3
Csprs	predicted gene, EG665378 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001075215]	ENSMUSG00000079457	-2
Csprs	Component of Sp100-rs [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q99388]	ENSMUSG00000061852	-2
Ctla2a	Protein CTLA-2-alpha Precursor (Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2-alpha) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P12399]	ENSMUSG00000044258	-4
Ctla2a	Protein CTLA-2-alpha Precursor (Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2-alpha) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P12399]	ENSMUSG00000044258	-3
Ctla2b	Protein CTLA-2-beta (Cytotoxic T lymphocyte-associated	ENSMUSG00000074874	-3

	protein 2-beta) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P12400]		
Ctla2b	Protein CTLA-2-beta (Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2-beta) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P12400]	ENSMUSG00000074874	-2
Cxadr	Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog Precursor (mCAR)(CAR) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P97792]	ENSMUSG00000022865	2
Cxcl1	Growth-regulated alpha protein Precursor (C-X-C motif chemokine 1)(Platelet-derived growth factor-inducible protein KC)(Secretory protein N51) [Contains KC(5-72)(KC-T)(Hematopoietic synergistic factor)(HSF)] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P12850]	ENSMUSG00000029380	2
Cxcl10	C-X-C motif chemokine 10 Precursor (Small-inducible cytokine B10)(Interferon-gamma-induced protein CRG-2)(Gamma-IP10)(IP-10)(C7) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P17515]	ENSMUSG00000034855	-3
Cxcl12	Stromal cell-derived factor 1 Precursor (SDF-1)(C-X-C motif chemokine 12)(Pre-B cell growth-stimulating factor)(PBSF)(12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate repressed protein 1)(TPAR1)(Thymic lymphoma cell-stimulating factor)(TLSF) [Source:UniProtKB/Swiss-P	ENSMUSG00000061353	-2
Cxcr7	C-X-C chemokine receptor type 7 (CXC-R7)(CXCR-7)(G-protein coupled receptor RDC1 homolog)(RDC-1)(Chemokine orphan receptor 1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P56485]	ENSMUSG00000044337	-3
Cyb561	Cytochrome b561 (Cytochrome b-561) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q60720]	ENSMUSG00000019590	2
Cyp2d22	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 22 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_062797]	ENSMUSG00000061740	3
Cyp2f2	Cytochrome P450 2F2 (EC 1.14.14.-)(CYPIIF2)(Naphthalene dehydrogenase)(Naphthalene hydroxylase)(P450-NAH-2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P33267]	ENSMUSG00000052974	3
Cyp7b1	25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase (Oxysterol 7-alpha-hydroxylase)(EC 1.14.13.100)(Cytochrome P450 7B1)(HCT-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q60991]	ENSMUSG00000039519	4
Dact1	Dapper homolog 1 (MDpr1)(Frodo)(Thymus-expressed novel gene 3 protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8R4A3]	ENSMUSG00000044548	2
Dbf4	Protein DBF4 homolog A (MuDBF4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9QZ41]	ENSMUSG00000002297	-2
Dgat2	Diacylglycerol O-acyltransferase 2 (EC 2.3.1.20)(Diglyceride acyltransferase 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9DCV3]	ENSMUSG00000030747	2
EG634650	guanylate-binding protein 10 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001034735]	ENSMUSG00000054588	-3
Egln3	Egl nine homolog 3 (EC 1.14.11.-)(Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 3)(HIF-prolyl hydroxylase 3)(HIF-PH3)(SM-20) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q91UZ4]	ENSMUSG00000035105	3
Eif1ay	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal (eIF-1A X isoform)(eIF-4C) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BMJ3]	ENSMUSG00000067194	-2
Elovl4	Elongation of very long chain fatty acids protein 4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9EQC4]	ENSMUSG00000032262	-2
Enpp1	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1 (E-NPP 1)(Phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase 1)(Plasma-cell membrane glycoprotein PC-1)(Lymphocyte antigen 41)(Ly-41) [Includes Alkaline phosphodiesterase I(EC 3.1.4.1);Nucleotid	ENSMUSG00000037370	4
Enpp1	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1 (E-NPP 1)(Phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase 1)(Plasma-cell membrane glycoprotein PC-1)(Lymphocyte antigen 41)(Ly-41) [Includes Alkaline phosphodiesterase I(EC 3.1.4.1);Nucleotid	ENSMUSG00000037370	2

Enpp5	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5 Precursor (E-NPP5)(NPP-5)(EC 3.1.-.-) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9EQG7]	ENSMUSG00000023960	3
Ereg	Proepiregulin Precursor [Contains Epiregulin(EPR)] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61521]	ENSMUSG00000029377	2
Errfi1	ERBB receptor feedback inhibitor 1 (Mitogen-inducible gene 6 protein homolog)(Mig-6) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q99JZ7]	ENSMUSG00000028967	2
Etv1	ETS translocation variant 1 (Protein ER81) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P41164]	ENSMUSG00000004151	2
Fabp4	Fatty acid-binding protein, adipocyte (A-FABP)(AFABP)(Fatty acid-binding protein 4)(Adipocyte lipid-binding protein)(ALBP)(P2 adipocyte protein)(Myelin P2 protein homolog)(3T3-L1 lipid-binding protein)(Protein 422)(P15) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P0]	ENSMUSG00000062515	3
Fabp4	Fatty acid-binding protein, adipocyte (A-FABP)(AFABP)(Fatty acid-binding protein 4)(Adipocyte lipid-binding protein)(ALBP)(P2 adipocyte protein)(Myelin P2 protein homolog)(3T3-L1 lipid-binding protein)(Protein 422)(P15) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P0]	ENSMUSG00000062515	3
Fah	Fumarylacetoacetase (FAA)(EC 3.7.1.2)(Fumarylacetoacetate hydrolase)(Beta-diketonase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P35505]	ENSMUSG00000030630	3
Fam43a	Protein FAM43A [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BUP8]	ENSMUSG00000046546	-2
Fbln1	Fibulin-1 Precursor (FIBL-1)(Basement-membrane protein 90)(BM-90) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q08879]	ENSMUSG00000006369	2
Fgd1	FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 1 (Faciogenital dysplasia 1 protein homolog)(Zinc finger FYVE domain-containing protein 3)(Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor FGD1)(Rho/Rac GEF) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P52734]	ENSMUSG00000025265	-2
Fgl2	Fibroleukin Precursor (Fibrinogen-like protein 2)(Prothrombinase)(Cytotoxic T-lymphocyte-specific protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P12804]	ENSMUSG00000039899	4
Fli1	Friend leukemia integration 1 transcription factor (Retroviral integration site protein Fli-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P26323]	ENSMUSG00000016087	-2
Flt4	Vascular endothelial growth factor receptor 3 Precursor (VEGFR-3)(EC 2.7.10.1)(Tyrosine-protein kinase receptor FLT4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P35917]	ENSMUSG00000020357	2
Fstl3	Follistatin-related protein 3 Precursor (Follistatin-like 3)(Follistatin-related gene protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9EQC7]	ENSMUSG00000020325	2
Gas6	Growth arrest-specific protein 6 Precursor (GAS-6)(AXL receptor tyrosine kinase ligand) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61592]	ENSMUSG00000031451	-2
Gbp2	Interferon-induced guanylate-binding protein 2 (Guanine nucleotide-binding protein 2)(GTP-binding protein 2)(GBP-2)(mGBP-2)(mGBP2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9Z0E6]	ENSMUSG00000028270	-3
Gbp2	Interferon-induced guanylate-binding protein 2 (Guanine nucleotide-binding protein 2)(GTP-binding protein 2)(GBP-2)(mGBP-2)(mGBP2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9Z0E6]	ENSMUSG00000028270	-3
Gbp3	Guanylate-binding protein 4 (Guanine nucleotide-binding protein 4)(GTP-binding protein 4)(GBP-4)(Guanylate-binding protein 3)(GTP-binding protein 3)(GBP-3) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61107]	ENSMUSG00000028268	-3
Gbp6	guanylate binding protein 7 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_663520]	ENSMUSG00000040253	-3

Gcnt2	N-acetyllactosaminide beta-1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase (N-acetylglucosaminyltransferase)(EC 2.4.1.150)(I-branching enzyme)(IGNT)(Large I antigen-forming beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P97402]	ENSMUSG00000021360	5
Gcnt2	N-acetyllactosaminide beta-1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase (N-acetylglucosaminyltransferase)(EC 2.4.1.150)(I-branching enzyme)(IGNT)(Large I antigen-forming beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P97402]	ENSMUSG00000021360	2
Gda	Guanine deaminase (Guanase)(Guanine aminase)(EC 3.5.4.3)(Guanine aminohydrolase)(GAH) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9R111]	ENSMUSG00000058624	2
Gfra1	GDNF family receptor alpha-1 Precursor (GFR-alpha-1)(GDNF receptor alpha)(GDNFR-alpha)(TGF-beta-related neurotrophic factor receptor 1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P97785]	ENSMUSG00000025089	3
Gja1	Gap junction alpha-1 protein (Connexin-43)(Cx43)(Gap junction 43 kDa heart protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P23242]	ENSMUSG00000050953	3
Gja1	Gap junction alpha-1 protein (Connexin-43)(Cx43)(Gap junction 43 kDa heart protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P23242]	ENSMUSG00000050953	2
Gja1	Gap junction alpha-1 protein (Connexin-43)(Cx43)(Gap junction 43 kDa heart protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P23242]	ENSMUSG00000050953	2
Gja1	Gap junction alpha-1 protein (Connexin-43)(Cx43)(Gap junction 43 kDa heart protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P23242]	ENSMUSG00000050953	2
Gng2	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2 Precursor (G gamma-I) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P63213]	ENSMUSG00000043004	2
Gpc4	Glypican-4 Precursor (K-glypican) [Contains Secreted glypican-4] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P51655]	ENSMUSG00000031119	2
Gpnmb	Transmembrane glycoprotein NMB Precursor (Dendritic cell-associated transmembrane protein)(DC-HIL) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q99P91]	ENSMUSG00000029816	3
H19	M.musculus H19 mRNAMCG11084 ; [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q61639]	ENSMUSG00000000031	4
Has2	Hyaluronan synthase 2 (EC 2.4.1.212)(Hyaluronate synthase 2)(Hyaluronic acid synthase 2)(HA synthase 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P70312]	ENSMUSG00000022367	3
Has2	Hyaluronan synthase 2 (EC 2.4.1.212)(Hyaluronate synthase 2)(Hyaluronic acid synthase 2)(HA synthase 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P70312]	ENSMUSG00000022367	3
Hist1h2bc	Histone H2B type 1-C/E/G [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q6ZWY9]	ENSMUSG00000018102	-2
Hist1h2bc	Histone H2B type 1-C/E/G [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q6ZWY9]	ENSMUSG00000018102	-2
Hist1h2be	Histone H2B type 1-C/E/G [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q6ZWY9]	ENSMUSG00000047246	-2
Hist1h2bf	Histone H2B type 1-F/J/L (H2B 291A) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P10853]	ENSMUSG00000069268	-2
Hist1h2bg	Histone H2B type 1-C/E/G [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q6ZWY9]	ENSMUSG00000058385	-2
Hist1h2bh	Histone H2B type 1-H (h2B-221) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q64478]	ENSMUSG00000064168	-2
Hist1h2bi	Histone H2B type 1-F/J/L (H2B 291A) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P10853]	ENSMUSG00000069300	-2
Hist1h2bk	Histone H2B type 1-K [Source:UniProtKB/Swiss-	ENSMUSG00000062727	-2

	Prot;Acc:Q8CGP1]		
Hist1h2bl	Histone H2B type 1-F/J/L (H2B 291A) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P10853]	ENSMUSG00000069314	-2
Hist1h2bm	Histone H2B type 1-M (H2B 291B) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P10854]	ENSMUSG00000058189	-2
Hist1h2bn	Histone H2B type 1-F/J/L (H2B 291A) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P10853]	ENSMUSG00000069271	-2
Hist1h2bp	Histone H2B type 1-P [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8CGP2]	ENSMUSG00000069308	-2
Hlf	Hepatic leukemia factor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BW74]	ENSMUSG00000003949	3
Hp	Haptoglobin Precursor [Contains Haptoglobin alpha chain;Haptoglobin beta chain] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61646]	ENSMUSG00000031722	6
Hspa4l	Heat shock 70 kDa protein 4L (Osmotic stress protein 94)(Heat shock 70-related protein APG-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P48722]	ENSMUSG00000025757	2
Htra1	Serine protease HTRA1 Precursor (EC 3.4.21.-)(Serine protease 11) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9R118]	ENSMUSG00000006205	2
Htra1	Serine protease HTRA1 Precursor (EC 3.4.21.-)(Serine protease 11) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9R118]	ENSMUSG00000006205	2
Id2	DNA-binding protein inhibitor ID-2 (Inhibitor of DNA binding 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P41136]	ENSMUSG00000020644	-2
Id4	DNA-binding protein inhibitor ID-4 (Inhibitor of DNA binding 4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P41139]	ENSMUSG00000021379	-3
Id4	DNA-binding protein inhibitor ID-4 (Inhibitor of DNA binding 4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P41139]	ENSMUSG00000021379	-3
Idi1	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1 (EC 5.3.3.2)(Isopentenyl pyrophosphate isomerase 1)(IPP isomerase 1)(IPPI1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P58044]	ENSMUSG00000058258	2
Idi1	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1 (EC 5.3.3.2)(Isopentenyl pyrophosphate isomerase 1)(IPP isomerase 1)(IPPI1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P58044]	ENSMUSG00000058258	2
Ifi27l2a	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_084079]	ENSMUSG00000079017	-3
Ifi44	Interferon-induced protein 44 (Microtubule-associated protein 44) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BV66]	ENSMUSG00000028037	-3
Ifi47	interferon gamma inducible protein 47 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_032356]	ENSMUSG00000078920	-2
Ifih1	Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1 (EC 3.6.1.-)(Interferon induced with helicase C domain protein 1)(Helicase with 2 CARD domains)(Helicard)(Melanoma differentiation-associated protein 5)(MDA-5) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8R5]	ENSMUSG00000026896	-2
Ifit1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT-1)(Interferon-induced 56 kDa protein)(IFI-56K)(Glucocorticoid-attenuated response gene 16 protein)(GARG-16) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q64282]	ENSMUSG00000034459	-5
Igf2	Insulin-like growth factor II Precursor (Multiplication-stimulating polypeptide)(IGF-II) [Contains Preptin] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P09535]	ENSMUSG00000048583	2
Igtp	interferon gamma induced GTPase [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_061208]	ENSMUSG00000078853	-3
Il33	Interleukin-33 Precursor (IL-33) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BVZ5]	ENSMUSG00000024810	2

Il6	Interleukin-6 Precursor (IL-6)(Interleukin HP-1)(B-cell hybridoma growth factor) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P08505]	ENSMUSG00000025746	5
Inhbb	Inhibin beta B chain Precursor (Activin beta-B chain) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q04999]	ENSMUSG00000037035	2
Irf9	Interferon regulatory factor 9 (IRF-9)(Transcriptional regulator ISGF3 subunit gamma)(IFN-alpha-responsive transcription factor subunit)(Interferon-stimulated gene factor 3 gamma)(ISGF3 p48 subunit)(ISGF-3 gamma) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61179]	ENSMUSG00000002325	-2
Irgm1	Immunity-related GTPase family M protein (EC 3.6.5.-)(Immunity-related GTPase family M protein 1)(Interferon-inducible protein 1)(LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage protein 47)(LRG-47) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q60766]	ENSMUSG00000046879	-2
Irgm2	interferon inducible GTPase 2 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_062313]	ENSMUSG00000069874	-3
Itga6	Integrin alpha-6 Precursor (VLA-6)(CD49 antigen-like family member F)(CD49f antigen) [Contains Integrin alpha-6 heavy chain;Integrin alpha-6 light chain] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61739]	ENSMUSG00000027111	3
Itga7	Integrin alpha-7 Precursor [Contains Integrin alpha-7 heavy chain;Integrin alpha-7 light chain] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61738]	ENSMUSG00000025348	2
Itm2a	Integral membrane protein 2A (E25 protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61500]	ENSMUSG00000031239	3
Jarid1c	Histone demethylase JARID1C (EC 1.14.11.-)(Jumonji/ARID domain-containing protein 1C)(Protein SmcX)(Protein Xe169) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P41230]	ENSMUSG00000025332	-2
Klc3	Kinesin light chain 3 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q91W40]	ENSMUSG00000040714	2
Klf4	Krueppel-like factor 4 (Gut-enriched krueppel-like factor)(Epithelial zinc finger protein EZF) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q60793]	ENSMUSG00000003032	-2
Klhl13	Kelch-like protein 13 (BTB and kelch domain-containing protein 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q80TF4]	ENSMUSG00000036782	5
Klra2	Killer cell lectin-like receptor 2 (T-cell surface glycoprotein Ly-49B)(Lymphocyte antigen 49b)(Ly-49b) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q60660]	ENSMUSG00000030187	3
Klra4	Killer cell lectin-like receptor 4 (T-cell surface glycoprotein Ly-49D)(Lymphocyte antigen 49d)(Ly-49d) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q60651]	ENSMUSG00000079852	2
Kng1	Kininogen-1 Precursor [Contains Kininogen-1 heavy chain;Bradykinin;Kininogen-1 light chain] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O08677]	ENSMUSG00000022875	5
Kng2	kininogen 2 isoform 3 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001095880]	ENSMUSG00000060459	5
Lama4	Laminin subunit alpha-4 Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P97927]	ENSMUSG00000019846	3
Lama4	Laminin subunit alpha-4 Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P97927]	ENSMUSG00000019846	2
Lamb1-1	Laminin subunit beta-1 Precursor (Laminin B1 chain) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P02469]	ENSMUSG00000002900	2
Larp6	La-related protein 6 (La ribonucleoprotein domain family member 6)(Acheron)(Achn) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BN59]	ENSMUSG00000034839	4
Lbh	Protein LBH (Limb bud and heart-expressed protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CX60]	ENSMUSG00000024063	2

Lcn2	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin Precursor (NGAL)(p25)(SV-40-induced 24P3 protein)(Lipocalin-2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P11672]	ENSMUSG00000026822	5
Lgals3bp	Galectin-3-binding protein Precursor (Lectin galactoside-binding soluble 3-binding protein)(Cyp-C-associated protein)(CyCAP)(Protein MAMA) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q07797]	ENSMUSG00000033880	-2
Lgr5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 Precursor (G-protein coupled receptor 49)(Orphan G-protein coupled receptor FEX) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9Z1P4]	ENSMUSG00000020140	2
Lifr	Leukemia inhibitory factor receptor Precursor (LIF receptor)(LIF-R)(D-factor/LIF receptor)(CD118 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P42703]	ENSMUSG00000054263	4
Lmcd1	LIM and cysteine-rich domains protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8VEE1]	ENSMUSG00000057604	2
Lpl	Lipoprotein lipase Precursor (LPL)(EC 3.1.1.34) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P11152]	ENSMUSG00000015568	3
Ly6f	Lymphocyte antigen 6F Precursor (Ly-6F)(Ly-6F.1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P35460]	ENSMUSG00000022583	-2
Mcp8	Mast cell protease 8 Precursor (EC 3.4.21.-)(MMCP-8) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P43430]	ENSMUSG00000022157	2
Meg3	Putative uncharacterized protein Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8CCV7]	ENSMUSG00000021268	-2
Mest	Mesoderm-specific transcript protein (Paternally-expressed gene 1 protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q07646]	ENSMUSG00000051855	4
Metrnl	Meteorin-like protein Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8VE43]	ENSMUSG00000039208	-2
Mfap5	Microfibrillar-associated protein 5 Precursor (MFAP-5)(Microfibril-associated glycoprotein 2)(MAGP-2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9QZJ6]	ENSMUSG00000030116	3
Mgst1	Microsomal glutathione S-transferase 1 (Microsomal GST-1)(EC 2.5.1.18)(Microsomal GST-I) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q91VS7]	ENSMUSG00000008540	5
Mgst2	microsomal glutathione S-transferase 2 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_778160]	ENSMUSG00000074604	2
Mical1	NEDD9-interacting protein with calponin homology and LIM domains (Molecule interacting with CasL protein 1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8VDP3]	ENSMUSG00000019823	2
Mmd	Monocyte to macrophage differentiation protein (Progestin and adipoQ receptor family member XI) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CQY7]	ENSMUSG00000003948	2
Mmd	Monocyte to macrophage differentiation protein (Progestin and adipoQ receptor family member XI) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CQY7]	ENSMUSG00000003948	2
Mmp13	Collagenase 3 Precursor (EC 3.4.24.-)(Matrix metalloproteinase-13)(MMP-13) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P33435]	ENSMUSG00000050578	6
Mmp3	Stromelysin-1 Precursor (SL-1)(EC 3.4.24.17)(Matrix metalloproteinase-3)(MMP-3)(Transin-1)(EMS-2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P28862]	ENSMUSG00000043613	4
Mogat2	2-acylglycerol O-acyltransferase 2 (EC 2.3.1.22)(Monoacylglycerol O-acyltransferase 2)(Acyl CoA:monoacylglycerol acyltransferase 2)(MGAT2)(Diacylglycerol acyltransferase 2-like protein 5)(Monoacylglycerol O-acyltransferase 1-like) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P33435]	ENSMUSG00000052396	2
Mpa2l	Macrophage activation 2 like [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_919317]	ENSMUSG00000079362	-3

Mrgprf	Mas-related G-protein coupled receptor member F (Mas-related gene F protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8VCJ6]	ENSMUSG00000031070	2
Ms4a4d	Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 4D [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q99N05]	ENSMUSG00000024678	4
Msln	Mesothelin Precursor (Pre-pro-megakaryocyte-potentiating factor) [Contains Megakaryocyte-potentiating factor(MPF);Mesothelin, cleaved form] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61468]	ENSMUSG00000063011	3
Mtap	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase (EC 2.4.2.28)(5'-methylthioadenosine phosphorylase)(MTA phosphorylase)(MTAPase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CQ65]	ENSMUSG00000062937	-2
Mtap	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase (EC 2.4.2.28)(5'-methylthioadenosine phosphorylase)(MTA phosphorylase)(MTAPase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CQ65]	ENSMUSG00000062937	-2
Mx1	myxovirus (influenza virus) resistance 1 (Mx1), transcribed RNA [Source:RefSeq DNA;Acc:NR_003520]	ENSMUSG00000000386	-2
Myl9	Myosin regulatory light polypeptide 9 (Myosin regulatory light chain 9)(Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CQ19]	ENSMUSG00000067818	2
Mylk	Myosin light chain kinase, smooth muscle (MLCK)(EC 2.7.11.18)(Telokin)(Kinase-related protein)(KRP) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q6PDN3]	ENSMUSG00000022836	-2
Mylk	Myosin light chain kinase, smooth muscle (MLCK)(EC 2.7.11.18)(Telokin)(Kinase-related protein)(KRP) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q6PDN3]	ENSMUSG00000022836	-2
Ndn	Necdin [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P25233]	ENSMUSG00000033585	-2
Ndn	Necdin [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P25233]	ENSMUSG00000033585	-2
Ndn	Necdin [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P25233]	ENSMUSG00000033585	-2
Nkd2	Protein naked cuticle homolog 2 (Naked-2)(mNkd2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8VE28]	ENSMUSG00000021567	2
Npr3	Atrial natriuretic peptide clearance receptor Precursor (Atrial natriuretic peptide C-type receptor)(ANPRC)(ANP-C)(NPR-C)(EF-2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P70180]	ENSMUSG00000022206	-3
Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_660262]	ENSMUSG00000032690	-2
Oasl2	54 kDa 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like protein 2 (EC 2.7.7.-)(p54 OASL)(p54OASL)(M1204) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9Z2F2]	ENSMUSG00000029561	-3
P2ry14	P2Y purinoceptor 14 (P2Y14)(UDP-glucose receptor)(G-protein coupled receptor 105) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ESG6]	ENSMUSG00000036381	3
Papss2	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthetase 2 (PAPS synthetase 2)(PAPSS 2)(Sulfurylase kinase 2)(SK 2)(SK2) [Includes Sulfate adenylyltransferase(EC 2.7.7.4)(Sulfate adenylyl transferase)(SAT)(ATP-sulfurylase);Adenylyl-sulfate kinase(EC	ENSMUSG00000024899	2
Pard6b	Partitioning defective 6 homolog beta (PAR-6 beta)(PAR-6B) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9JK83]	ENSMUSG00000044641	4
Pard6b	Partitioning defective 6 homolog beta (PAR-6 beta)(PAR-6B) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9JK83]	ENSMUSG00000044641	2
Parp10	Plec1 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8CIE4]	ENSMUSG00000063268	-2
Parp14	Poly [ADP-ribose] polymerase 14 (PARP-14)(EC 2.4.2.30)(Collaborator of STAT6)(CoaSt6) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q2EMV9]	ENSMUSG00000034422	-2
Parp9	Poly [ADP-ribose] polymerase 9 (PARP-9)(EC 2.4.2.30)(B aggressive lymphoma protein homolog)	ENSMUSG00000022906	-2

[Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8CAS9]

Pcdh7	protocadherin 7 isoform 2 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_061234]	ENSMUSG00000029108	2
Pde1a	Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A (Cam-PDE 1A)(EC 3.1.4.17)(61 kDa Cam-PDE) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q61481]	ENSMUSG00000059173	3
Pdk4	[Pyruvate dehydrogenase [lipoamide]] kinase isozyme 4, mitochondrial Precursor (EC 2.7.11.2)(Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O70571]	ENSMUSG00000019577	4
Pdlim1	PDZ and LIM domain protein 1 (Elfin)(LIM domain protein CLP-36)(C-terminal LIM domain protein 1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O70400]	ENSMUSG00000055044	4
Pdrq1	p53 and DNA damage-regulated protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P59048]	ENSMUSG00000027472	-2
Pex11a	Peroxisomal membrane protein 11A (Peroxin-11A)(Peroxisomal biogenesis factor 11A)(PEX11alpha) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9Z211]	ENSMUSG00000030545	4
Pla2g7	Platelet-activating factor acetylhydrolase Precursor (PAF acetylhydrolase)(EC 3.1.1.47)(PAF 2-acylhydrolase)(LDL-associated phospholipase A2)(LDL-PLA(2))(2-acetyl-1-alkylglycerophosphocholine esterase)(1-alkyl-2-acetyl-glycerophosphocholine esterase) [Sour	ENSMUSG00000023913	5
Plac8	Placenta-specific gene 8 protein (Protein C15)(Onzin) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9JI48]	ENSMUSG00000029322	3
Plat	Tissue-type plasminogen activator Precursor (t-plasminogen activator)(t-PA)(tPA)(EC 3.4.21.68) [Contains Tissue-type plasminogen activator chain A;Tissue-type plasminogen activator chain B] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P11214]	ENSMUSG00000031538	3
Plekha2	Pleckstrin homology domain-containing family A member 2 (Tandem PH domain-containing protein 2)(TAPP-2)(PH domain-containing adaptor PHAD47) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ERS5]	ENSMUSG00000031557	2
Pltp	Phospholipid transfer protein Precursor (Lipid transfer protein II) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P55065]	ENSMUSG00000017754	-2
Pmaip1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (Noxa) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9JM54]	ENSMUSG00000024521	4
Pon2	Serum paraoxonase/arylesterase 2 (PON 2)(EC 3.1.1.2)(EC 3.1.8.1)(Serum aryldialkylphosphatase 2)(A-esterase 2)(Aromatic esterase 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62086]	ENSMUSG00000032667	4
Pon3	Serum paraoxonase/lactonase 3 (EC 3.1.1.-) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62087]	ENSMUSG00000029759	4
Postn	Periostin Precursor (PN)(Osteoblast-specific factor 2)(OSF-2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62009]	ENSMUSG00000027750	-5
Prdx4	Peroxiredoxin-4 (EC 1.11.1.15)(Prx-IV)(Thioredoxin peroxidase AO372)(Thioredoxin-dependent peroxide reductase AO372)(Antioxidant enzyme AOE372) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O08807]	ENSMUSG00000025289	-2
Prdx4	Peroxiredoxin-4 (EC 1.11.1.15)(Prx-IV)(Thioredoxin peroxidase AO372)(Thioredoxin-dependent peroxide reductase AO372)(Antioxidant enzyme AOE372) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O08807]	ENSMUSG00000025289	-2
Prelp	Prolargin Precursor (Proline-arginine-rich end leucine-rich repeat protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9JK53]	ENSMUSG00000041577	-2
Prickle1	Prickle-like protein 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q3U5C7]	ENSMUSG00000036158	2

Procr	Endothelial protein C receptor Precursor (Endothelial cell protein C receptor)(Activated protein C receptor)(APC receptor)(Centrocyclin)(Centrosomal protein CCD41)(CD201 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q64695]	ENSMUSG00000027611	5
Ptger4	Prostaglandin E2 receptor EP4 subtype (PGE receptor, EP4 subtype)(Prostanoid EP4 receptor) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P32240]	ENSMUSG00000039942	2
Ptgs2	Prostaglandin G/H synthase 2 Precursor (EC 1.14.99.1)(Cyclooxygenase-2)(COX-2)(Prostaglandin-endoperoxide synthase 2)(Prostaglandin H2 synthase 2)(PGH synthase 2)(PGHS-2)(PHS II)(Glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase)(Gripghs)(TIS10 protein	ENSMUSG00000032487	2
Pvrl2	Poliovirus receptor-related protein 2 Precursor (Murine herpesvirus entry protein B)(mHvEB)(Nectin-2)(Poliovirus receptor homolog)(CD112 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P32507]	ENSMUSG00000062300	2
Pvrl2	Poliovirus receptor-related protein 2 Precursor (Murine herpesvirus entry protein B)(mHvEB)(Nectin-2)(Poliovirus receptor homolog)(CD112 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P32507]	ENSMUSG00000062300	2
Rab40b	Ras-related protein Rab-40B (SOCS box-containing protein RAR) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8VHP8]	ENSMUSG00000025170	-2
Rarres2	Retinoic acid receptor responder protein 2 Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9DD06]	ENSMUSG00000009281	3
Rarres2	Retinoic acid receptor responder protein 2 Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9DD06]	ENSMUSG00000009281	2
Rcbtb2	RCC1 and BTB domain-containing protein 2 (Regulator of chromosome condensation and BTB domain-containing protein 2)(Chromosome condensation 1-like) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q99LJ7]	ENSMUSG00000022106	-2
Rgs16	Regulator of G-protein signaling 16 (RGS16)(Retinally abundant regulator of G-protein signaling)(RGS-R)(A28-RGS14P) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P97428]	ENSMUSG00000026475	2
Rhpn2	Rhopilin-2 (GTP-Rho-binding protein 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BWR8]	ENSMUSG00000030494	5
Rhpn2	Rhopilin-2 (GTP-Rho-binding protein 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BWR8]	ENSMUSG00000030494	3
Rnase4	Ribonuclease 4 Precursor (RNase 4)(EC 3.1.27.-) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9JJH1]	ENSMUSG00000021876	-3
Rora	Nuclear receptor ROR-alpha (Retinoid-related orphan receptor-alpha)(Nuclear receptor RZR-alpha)(Nuclear receptor subfamily 1 group F member 1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P51448]	ENSMUSG00000032238	2
Rora	Nuclear receptor ROR-alpha (Retinoid-related orphan receptor-alpha)(Nuclear receptor RZR-alpha)(Nuclear receptor subfamily 1 group F member 1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P51448]	ENSMUSG00000032238	2
RP23-14F5.7	hypothetical protein LOC620913 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001039005]	ENSMUSG00000048852	-3
RP23-160B4.1		ENSMUSG00000081752	-2
RP23-38E20.1	Histone H2B type 1-F/J/L (H2B 291A) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P10853]	ENSMUSG00000069307	-2
RP23-38E20.6	Histone H2B type 1-F/J/L (H2B 291A) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P10853]	ENSMUSG00000069303	-2
RP23-3G8.1		ENSMUSG00000081937	3
Rtp4	Receptor-transporting protein 4 (28 kDa interferon-responsive protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9ER80]	ENSMUSG00000033355	-3
Saa3	Serum amyloid A-3 protein Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P04918]	ENSMUSG00000040026	5

Sc4mol	C-4 methylsterol oxidase (EC 1.14.13.72)(Methylsterol monooxygenase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CRA4]	ENSMUSG00000031604	2
Sec16b	Protein transport protein Sec16B (Protein SEC16 homolog B)(Regucalcin gene promoter region-related protein p117)(RGPR-p117)(Leucine zipper transcription regulator 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q91XT4]	ENSMUSG00000026589	3
Sema3e	Semaphorin-3E Precursor (Semaphorin-H)(Sema H) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P70275]	ENSMUSG00000063531	4
Sept2	Septin-2 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 5)(NEDD-5) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P42208]	ENSMUSG00000026276	3
Sept4	Uncharacterized protein C17orf47 homolog [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q5ND19]	ENSMUSG00000020486	2
Serpinb9g	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 9g [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_035585]	ENSMUSG00000057726	2
Sfrp1	Secreted frizzled-related protein 1 Precursor (sFRP-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8C4U3]	ENSMUSG00000031548	2
Sfrp1	Secreted frizzled-related protein 1 Precursor (sFRP-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8C4U3]	ENSMUSG00000031548	2
Sh3kbp1	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1 (SH3-containing, expressed in tumorigenic astrocytes)(Regulator of ubiquitous kinase)(Ruk) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8R550]	ENSMUSG00000040990	-2
Six1	Homeobox protein SIX1 (Sine oculis homeobox homolog 1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62231]	ENSMUSG00000051367	-2
Slc1a3	Excitatory amino acid transporter 1 (Sodium-dependent glutamate/aspartate transporter 1)(GLAST-1)(High-affinity neuronal glutamate transporter)(Glial high affinity glutamate transporter)(Solute carrier family 1 member 3) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P	ENSMUSG00000005360	-2
Slc1a3	Excitatory amino acid transporter 1 (Sodium-dependent glutamate/aspartate transporter 1)(GLAST-1)(High-affinity neuronal glutamate transporter)(Glial high affinity glutamate transporter)(Solute carrier family 1 member 3) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P	ENSMUSG00000005360	-2
Slc24a3	Sodium/potassium/calcium exchanger 3 Precursor (Na(+)/K(+)/Ca(2+)-exchange protein 3) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q99PD7]	ENSMUSG00000063873	-2
Slc9a3r1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 (NHERF-1)(Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50)(EBP50)(Regulatory cofactor of Na(+)/H(+) exchanger)(Sodium-hydrogen exchanger regulatory factor 1)(Solute carrier family 9 isoform A3 regulatory fact	ENSMUSG00000020733	2
Slc9a3r1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 (NHERF-1)(Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50)(EBP50)(Regulatory cofactor of Na(+)/H(+) exchanger)(Sodium-hydrogen exchanger regulatory factor 1)(Solute carrier family 9 isoform A3 regulatory fact	ENSMUSG00000020733	2
Slit3	Slit homolog 3 protein Precursor (Slit-3)(Slit3) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9WVB4]	ENSMUSG00000056427	2
Slpi	Antileukoproteinase Precursor (ALP)(Secretory leukocyte protease inhibitor) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P97430]	ENSMUSG00000017002	2
Smarca1	Probable global transcription activator SNF2L1 (EC 3.6.1.-)(Nucleosome-remodeling factor subunit SNF2L)(ATP-dependent helicase SMARCA1)(SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 1)(DNA-dependent ATPase SNF	ENSMUSG00000031099	5
Sms	Spermine synthase (SPMSY)(EC 2.5.1.22)(Spermidine aminopropyltransferase) [Source:UniProtKB/Swiss-	ENSMUSG00000071708	-2

Prot;Acc:P97355]

Snca	Alpha-synuclein (Non-A beta component of AD amyloid)(Non-A4 component of amyloid precursor)(NACP) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O55042]	ENSMUSG00000025889	3
Socs2	Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2)(Cytokine-inducible SH2 protein 2)(CIS-2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O35717]	ENSMUSG00000020027	2
Socs3	Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3)(Cytokine-inducible SH2 protein 3)(CIS-3)(Protein EF-10) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O35718]	ENSMUSG00000053113	2
Socs3	Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3)(Cytokine-inducible SH2 protein 3)(CIS-3)(Protein EF-10) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O35718]	ENSMUSG00000053113	2
Sorbs1	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1 (Ponsin)(c-Cbl-associated protein)(CAP)(SH3 domain protein 5)(SH3P12) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62417]	ENSMUSG00000025006	2
Speg	Striated muscle-specific serine/threonine-protein kinase (EC 2.7.11.1)(Aortic preferentially expressed protein 1)(APEG-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62407]	ENSMUSG00000026207	4
Speg	Striated muscle-specific serine/threonine-protein kinase (EC 2.7.11.1)(Aortic preferentially expressed protein 1)(APEG-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62407]	ENSMUSG00000026207	2
Sqrdl	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial Precursor (EC 1.-.-.-) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9R112]	ENSMUSG00000005803	2
Sspn	Sarcospan (K-ras oncogene-associated protein)(Kirsten-Ras-associated protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62147]	ENSMUSG00000030255	-2
Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P42225]	ENSMUSG00000026104	-3
Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P42225]	ENSMUSG00000026104	-3
Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P42225]	ENSMUSG00000026104	-3
Steap4	Metalloreductase STEAP4 (EC 1.16.1.-)(Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 4)(Tumor necrosis factor-alpha-induced adipose-related protein)(Dudulin-4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q923B6]	ENSMUSG00000012428	8
Sytl2	Synaptotagmin-like protein 2 (Exophilin-4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q99N50]	ENSMUSG00000030616	2
Tagln	Transgelin (Smooth muscle protein 22-alpha)(SM22-alpha)(Actin-associated protein p27) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P37804]	ENSMUSG00000032085	4
Tcfap2a	Transcription factor AP-2 alpha (AP2-alpha)(Activating enhancer-binding protein 2 alpha)(AP-2 transcription factor)(Activator protein 2)(AP-2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P34056]	ENSMUSG00000021359	3
Tgtp1	T-cell specific GTPase [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_035709]	ENSMUSG00000078922	-3
Tgtp2	T-cell specific GTPase [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_035709]	ENSMUSG00000078921	-3
Thy1	Thy-1 membrane glycoprotein Precursor (Thy-1 antigen)(CD90 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P01831]	ENSMUSG00000032011	7
Tlr3	Toll-like receptor 3 Precursor (CD283 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q99MB1]	ENSMUSG00000031639	-2
Tlr3	Toll-like receptor 3 Precursor (CD283 antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q99MB1]	ENSMUSG00000031639	-2
Tmem140	Transmembrane protein 140 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BGY5]	ENSMUSG00000057137	-2

Tmem223	Transmembrane protein 223 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9CQE2]	ENSMUSG00000075043	2
Tmtc4	Transmembrane and TPR repeat-containing protein 4 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8BG19]	ENSMUSG00000041594	2
Tom111	TOM1-like protein 1 (Target of Myb-like protein 1)(Src-activating and signaling molecule protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q923U0]	ENSMUSG00000020541	3
Tpd52	Tumor protein D52 (mD52) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62393]	ENSMUSG00000027506	4
Tpd52	Tumor protein D52 (mD52) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62393]	ENSMUSG00000027506	3
Trp63	Tumor protein 63 (p63)(Transformation-related protein 63)(TP63)(Tumor protein p73-like)(p73L) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:O88898]	ENSMUSG00000022510	2
Usp18	Ubl carboxyl-terminal hydrolase 18 (EC 3.1.2.-)(Ubl thioesterase 18)(ISG15-specific-processing protease)(43 kDa ISG15-specific protease) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9WTV6]	ENSMUSG00000030107	-3
Vcan	Versican core protein Precursor (Large fibroblast proteoglycan)(Chondroitin sulfate proteoglycan core protein 2)(PG-M) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62059]	ENSMUSG00000021614	2
Vcan	Versican core protein Precursor (Large fibroblast proteoglycan)(Chondroitin sulfate proteoglycan core protein 2)(PG-M) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q62059]	ENSMUSG00000021614	2
Vip	VIP peptides Precursor [Contains Intestinal peptide PHI-42;Intestinal peptide PHI-27(Peptide histidine isoleucinamide 27);Vasoactive intestinal peptide(VIP)(Vasoactive intestinal polypeptide)] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P32648]	ENSMUSG00000019772	5
Wnt5a	Protein Wnt-5a Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P22725]	ENSMUSG00000021994	2
Wnt5a	Protein Wnt-5a Precursor [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P22725]	ENSMUSG00000021994	2
Xlr	X-linked lymphocyte-regulated protein PM1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P05531]	ENSMUSG00000054626	3
Zdhc2	Palmitoyltransferase ZDHHC2 (EC 2.3.1.-)(Zinc finger DHHC domain-containing protein 2)(DHHC-2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P59267]	ENSMUSG00000039470	3
Zfp467	Zinc finger protein 467 (Endothelial cell-derived zinc finger protein)(EZI) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8JZL0]	ENSMUSG00000068551	4
Zfp467	Zinc finger protein 467 (Endothelial cell-derived zinc finger protein)(EZI) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8JZL0]	ENSMUSG00000068551	4
Zfp503	Zinc finger protein 503 (Zinc finger protein Nolz-1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q7TMA2]	ENSMUSG00000039081	2

* El valor de Log 2 ratio se ha categorizado.